

UNIVERSITE DE PARIS - FACULTE DE PHARMACIE

Année 1970

Série E, N° 204

T H E S E

présentée

A LA FACULTE DE PHARMACIE

DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ETAT)

par

Herminé VOSKIAN

APPORTS NOUVEAUX
A L'ETUDE DU MAGNESIUM
EN BIOLOGIE

Soutenue le 25 mai 1970

Jury : M.M. les Professeurs M.L. GIRARD..... Président
J.E. COURTOIS.....
F. ROUSSELET..... Examineurs
J.P. MAURAT.....

Année 1970

Série E - N. 204

THESE
présentée
A LA FACULTE DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

par

Herminé VOSKIAN

APPORTS NOUVEAUX
A L'ETUDE DU MAGNESIUM EN BIOLOGIE

Soutenue le 25 mai 1970

Jury : MM. les Professeurs M.L. GIRARD..... Président

J.E. COURTOIS.....

F. ROUSSELET..... Examineurs

J.P. MAURAT.....

THESE

présentée

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN MÉDECINE

(Spécialité d'État)

par

Monsieur VIGARIAN

APPOSÉS NOUVEAUX

A L'ETUDE DU MACHESIM EN BIOLOGIE

Confermé le 25 mai 1970

Par M. les Docteurs M. H. OLIVARD, Président

J. L. COURTOIS, ... Examinateur

J. HONNERT, ... Examinateur

J. P. MAURAT, ... Examinateur



PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

M. MALANGEAU P.	DOYEN
M. GUILLOT M. 0 +.....	Assesseur
M. DELAVEAU P.	Assesseur
M. RODINEAU L. +.....	Secrétaire Général
Mme FERRARI S.	Attaché Principal d'Administration Universitaire Adjointe au Secrétaire Général
M. BRENN A. + ...	Attaché Principal d'Intendance Universi- taire
M. TRICAN J. N.	Attaché Principal d'Administration Universitaire
M. JEANDEL L.	Attaché d'Administration Universitaire
Mme ESPINASSE M. L.	Attaché d'Administration Universitaire
M. JACOB + ...	Attaché d'Administration Universitaire
Mme MUR A. M.	Attaché d'Administration Universitaire
Melle FRIZOL E.	Attaché d'Administration Universitaire

DOYEN HONORAIRE

M. VALETTE Guillaume O +

PROFESSEURS HONORAIRES

M. LAUNOY L.	O +
M. FLEURY P.	O +
M. PICON M.	O +

PROFESSEURS

M. JANOT M. M. O + Membre de l'Institut..	Pharmacie Galénique (T)
M. VALETTE G. O +.....	Pharmacodynamie (T)

M. PARIS R.	O +.....	Matière Médicale (T)
M. GUILLOT M.	O +.....	Physique (T)
M. GAUTIER J. A.	O +.....	Chimie Organique (T)
Melle LAMBIN S.	+.....	Microbiologie (T)
M. RAOUL Y.	+.....	Physiologie (T)
M. COURTOIS J.	+.....	Chimie Biologique
M. DOMANGE L.	O +.....	Chimie Générale et Minérale (T)
M. TRUHAUT R.	O + Membre de l'Institut.	Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)
M. MORETTE A.	+.....	Hydrologie (T)
M. CAVIER R.	+.....	Parasitologie (T)
M. QUEVAUVILLER A.	+.....	Hygiène et Education Sanitaire (T)
M. MOREAU R.	+.....	Pharmacie Chimique (T)
M. GERMAN A.....		Microbiologie (T)
M. PIETTE M.	+.....	Hématologie (T)
M. MALANGEAU P.....		Chimie Analytique (T)
M. GIRARD M.	+.....	Biochimie Appliquée (T)
M. DILLEMANN G.....		Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
M. DEYSSON G.	+.....	Botanique (T)
M. FLAHAUT J.....		Minéralogie (T)
M. RENAULT J.....		Chimie Organique (T)
M. LE HIR A.....		Pharmacie Galénique (T)
M. BOUDENE C.....		Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)
M. LARUELLE P.....		Physique (T)
M. ROSSIGNOL P.....		Pharmacodynamie (T)
M. MANGEOT A.....		Pharmacie Galénique Industrielle (T)
M. DELAVEAU P.....		Séméiologie et Pathologie Générale (T)
M. COHEN Y.....		Pharmacodynamie (T)

M. RENAULT H.	Physique
M. BOURDON R.	Chimie Analytique
M. REYNAUD P.	Pharmacie Chimique
M. LE MOAN R.	Toxicologie
M. POISSON J.	Pharmacie Galénique
M. MICHEL R.	Endocrinologie (T)
M. LECLERC M.	Hématologie
M. PERCHERON F.	Chimie Biologique
M. SAVEL J.	Biologie Animale
M. DESVIGNES A.	Cryptogamie et Technique Bactériologique

MAITRES DE CONFERENCES

M. PAOLETTI C.	Toxicologie
M. BORY J.	Microbiologie
M. MIOCQUE M.	Chimie Organique
M. GUIGNARD J. L.	Botanique Générale
M. GOUNELLE J. C.	Physiologie
M. BINET P.	Biologie Animale
M. COMBET FARNOUX C.	Chimie Organique
M. PLAT M.	Chimie Analytique
Mme PLAT M.	Législation et Déontologie Pharmaceutique
M. DELACOUX E.	Pharmacie Chimique
M. CAVE A.	Matière Médicale
M. PUISIEUX F.	Pharmacie Galénique
M. DUCHON D'ENGENIERES M.	Chimie Organique
M. ADOLPHE C.	Physique
M. GUERNET M.	Chimie Analytique
M. DIDRY J.	Mathématiques Appliquées aux Sciences expérimentales

A Monsieur le Professeur Maurice-Louis GIRARD

Professeur de Biochimie appliquée à la Faculté de

Pharmacie de Paris,

Pharmacien-Chef de l'Hôpital Lariboisière

Chevalier de la Légion d'Honneur

qui m'a fait le double honneur de m'accueillir parmi ses
élèves et d'avoir bien voulu accepter la présidence de cette
thèse pour laquelle ses conseils et ses encouragements constants
m'ont été d'un grand secours.

Qu'il veuille bien trouver ici un modeste témoignage de
ma respectueuse reconnaissance et de mon attachement profond.

A Monsieur le Professeur Jean Emile COURTOIS

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de
Pharmacie de Paris,

Membre de l'Académie Nationale de Médecine

Officier de la Légion d'Honneur

Inspecteur Général des Pharmacies de l'Assistance Publique

qui, après avoir guidé mes premiers pas en Biochimie
générale, m'a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

En témoignage de ma respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur Jean-Pierre MAURAT

Médecin des Hôpitaux

dont les travaux sur la pathologie du magnésium font autorité et qui a bien voulu m'associer à ses recherches de médecine expérimentale. Son accueil m'a vraiment touchée et les conseils qu'il m'a prodigués avec une souriante affabilité m'ont été très précieux pour la rédaction de ce travail.

A Monsieur le Professeur François ROUSSELET

Maître de Conférences Agrégé à la Faculté de
de Pharmacie de Paris

Assistant de Biologie de l'Hôpital Lariboisière

qui, tout au long de ce travail, a su me faire partager son enthousiasme pour la recherche et, en guide averti, me faire profiter de son expérience. De plus, ses attentions constantes ont scellé entre nous une profonde amitié.

En témoignage de sincère attachement et de profonde reconnaissance.

Au Révérend Père MADET S. J.

Chancelier de la Faculté Française de Médecine
et de Pharmacie de BEYROUTH,

Je voudrais exprimer ma sincère gratitude et
l'assurer de mes sentiments de reconnaissance et de
profond respect.

A tous mes Professeurs de Beyrouth, puis de Paris,

avec l'expression de ma fidèle gratitude.

A Monsieur Jacques CANAL,

Chef de Travaux à la Faculté de Pharmacie de Paris

Assistant de Biologie de l'Hôpital Lariboisière,

qui a bien voulu me faire bénéficier de sa grande compétence
en chromatographie et qui m'a toujours accueillie dans son labo-
ratoire avec infiniment de bienveillance

J'exprime mes sentiments les plus profonds.

Ma reconnaissance va vers tous ceux qui, au Laboratoire de
l'Hôpital Lariboisière ont contribué à créer une atmosphère de
parfaite entente, en particulier aux Assistants de Biologie :

Madame PAOLAGGI, Mademoiselle SORIA et
Monsieur DELATTRE.

Aux Internes en Pharmacie de l'Hôpital Lariboisière,

dont la présence amicale, la compréhension et l'esprit d'équipe ont dissipé mes appréhensions et rendu si sympathique l'ambiance de travail.

Avec l'expression de mon profond attachement.

A mes Amis,

A ceux qui m'ont tolérée, à ceux qui m'ont conseillée,
à ceux qui, avec moi, ont "pris le chemin".

Je souhaite tout le succès qu'ils méritent.

A la mémoire de mon Père,

qui reste ma fierté.

Puisse-je, par ce travail, avoir mérité l'affection et
l'estime qu'il me témoignait.

A ma Mère,

dont l'abnégation m'a permis d'entreprendre
et de poursuivre cette formation biologique.

Je dédie cette thèse en témoignage très affectueux
et profondément reconnaissant.

A mes Oncles,

qui ont eu la difficile tâche de remplacer mon Père et
de soutenir mes études.

J'exprime mes sentiments de sincère et fidèle gratitude

A mes Frères et à ma Soeur,

Avec toute mon affection.

INTRODUCTION

CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LE RÔLE DU MAGNESIUM EN BIOLOGIE EN LIAISON AVEC CELUI DU CALCIUM

Dès 1869, une des principales actions physiologiques du magnésium a été mise en évidence par JOLYET et CAHOURS (74) : effet depressor sur le système nerveux central et sur l'appareil musculaire ; HAY, en 1882, (58) a pu parler de "narcose magnésienne" après injection de sels magnésiens. Au début du siècle, DELBET attribue au magnésium un rôle de modificateur de terrain, en particulier vis-à-vis des phénomènes allergiques voire même du cancer. Depuis lors, on a observé l'intervention du magnésium dans nombre de phénomènes vitaux, tels les processus enzymatiques intervenant dans le métabolisme des lipides et des glucides, au niveau du muscle, dans le fonctionnement de la jonction neuro-musculaire de la plaque motrice et du système nerveux. Malgré ces observations, on peut dire que ce cation préoccupait assez peu le biologiste il y a encore vingt ans.

Le long désintéressement pour cet élément provient certainement de deux raisons fondamentales et étroitement dépendantes : l'insuffisance de connaissances du rôle du magnésium en pathologie humaine et le manque de méthodes sensibles et pratiques de dosage de ce constituant biologique. En effet, pendant longtemps, les déterminations biochimiques, d'ailleurs délicates et souvent peu précises, se sont limitées à celles de la concentration dans les liquides extra cellulaires de l'organisme facilement accessibles à l'exploration biologique, reflétant donc imparfaitement le métabolisme du magnésium, élément essentiellement intracellulaire.

Au cours des dernières années, de nombreux cliniciens se sont penchés sur les corrélations possibles entre les troubles de la magnésémie et certaines manifestations cliniques : spasmophilie, allergie, déficiences hépatiques, divers troubles neurologiques... Un véritable syndrome de

"déficit magnésien" se définit ainsi peu à peu, grâce essentiellement aux progrès de l'analyse biologique. Mais il faut bien reconnaître que pour l'instant, les points d'interrogation restent plus nombreux que les démonstrations solides.

La spectrophotométrie d'absorption atomique représente l'amélioration la plus importante sur le plan analytique par sa grande sensibilité et sa rapidité d'exécution, caractères requis pour permettre un travail en série dans le domaine de la recherche. Cette méthode s'applique facilement à la détermination des concentrations tissulaires après simple extraction de cet élément par digestion acide.

Disposant au laboratoire du Pr. GIRARD de cette possibilité d'analyse, nous avons cherché à étendre nos investigations sur quelques uns des problèmes susceptibles de présenter un intérêt clinique et essayé de fournir quelques données biochimiques nouvelles permettant de mieux appréhender le rôle du magnésium dans les processus vitaux.

D'autre part, l'étroite corrélation entre le magnésium et le calcium tant au niveau de l'absorption, de l'élimination que du métabolisme intermédiaire, nous a incité à étudier parallèlement le devenir du calcium dans certains cas.

Le champ d'exploration offert par les malades de l'Hôpital Lariboisière, les donneurs de sang de la banque de sang du même hôpital et l'animalerie du laboratoire de Médecine expérimentale de la Faculté de Médecine de Besançon mise à notre disposition par le Professeur MAURAT, nous a permis de réaliser ou plutôt d'ébaucher cette étude.

Celle-ci se trouve divisée en deux parties :

- Dans la première, essentiellement analytique, sont exposées et discutées les différentes méthodes,
 - . de dosage global du magnésium et du calcium.
 - . d'évaluation des différents états physicochimiques

(ioniques, complexés, liés aux protéines) de ces éléments. Une solution personnelle relative à la détermination du magnésium diffusible est proposée.

- La deuxième partie, plus biologique, est consacrée à l'étude du métabolisme du magnésium au cours de certains états pathologiques. Les résultats obtenus sur l'Homme malade, forcément limités par le nombre de patients, ont été nécessairement complétés par une importante étude de pathologie expérimentale utilisant le Rat (souche Wistar). C'est pourquoi cette partie débute par une étude de la répartition du magnésium dans les différents organes de cet animal. Puis, nous avons porté nos efforts dans deux directions complémentaires pour :

. préciser les effets de la vitamine D et des sécrétions thyroïdiennes sur le métabolisme du magnésium.

. étudier enfin la carence expérimentale en magnésium dans son mécanisme tissulaire comme dans ses effets secondaires en confrontant nos propres résultats avec ceux des autres expérimentateurs.

Le caractère souvent discret des variations pathologiques du magnésium tissulaire empêche, certes, souvent de conclure de façon absolue. Mais la remarquable stabilité physiologique des taux tissulaires constitue un argument supplémentaire en faveur de l'importance de cet élément, dont l'homéostasie semble assurée à la fois par le contrôle des mécanismes d'élimination et par la régulation de la mobilisation des réserves. Le sang occupe une place prépondérante dans ces processus comme semblent le montrer les amples variations des taux de Mg tant plasmatique que globulaire.

Nous avons conscience de n'avoir apporté dans ce travail que quelques lueurs sur un problème particulièrement complexe mais dont l'importance en pathologie humaine, comme en biochimie, s'accroît de jour en jour.

PREMIERE PARTIE

MOYENS D'ETUDE DU MAGNESIUM DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES

ETUDE COMPAREE AVEC CELLE DU CALCIUM

PREMIER CHAPITRE

DOSAGE GLOBAL DU MAGNESIUM ET DU CALCIUM DANS LES

MILIEUX BIOLOGIQUES

Bien qu'au cours de notre travail nous ayons exclusivement utilisé la spectrophotométrie d'absorption atomique comme technique de dosage, nous rappellerons les principales méthodes analytiques employées dans les travaux antérieurs auxquels nos résultats peuvent être confrontés.

I - DOSAGE DU MAGNESIUM

Les nombreuses techniques d'analyses chimiques du magnésium peuvent être classées en trois grands groupes selon qu'elles mettent en oeuvre une précipitation sélective, des réactions de complexation ou une coloration spécifique.

1 - 1 - Citons parmi les plus fréquemment utilisées, les techniques :

1 - 1 - 1 - basées sur l'insolubilité du phosphate ammoniacomagnésien.

Très anciennes (HOWLAND, 1917 (71) et DENIS, 1922 (35)), elles ont retrouvé une certaine faveur avec les travaux de SIMONSEN en 1947 (155), et MAURAT, en 1964 (105) a adapté cette technique au dosage du magnésium érythrocytaire. Dans tous les cas, la mesure finale correspond à une estimation colorimétrique du phosphore combiné.

1 - 1 - 2 - utilisant l'insolubilité du 8-hydroxyquinoéate de Mg :

Le précipité redissous est titré par bromométrie après copulation avec un diazoïque dans celle de PIGNARD (138).

1 - 1 - 3 - complexométriques : assez récentes (CARUBELLI (26), DREUX et GIRARD (38)), elles mettent à profit les différences d'affinité du Ca et du Mg pour le complexon (EDTA) en fonction du pH.

1 - 1 - 4 - colorimétriques : dans la technique de MASSON (105), le Jaune Titan fournit avec le magnésium une laque stabilisée par l'alcool polyvinylique. Le réactif de MANN et YOE (103) est une molécule complexe (1 azo-hydroxybenzène 3 (2-4 diméthyl carboxyanilido) naphtalène 1' (2 hydroxybenzène 4 sulfonate de sodium) fournissent, selon la technique de BOHUON (15) une coloration assez spécifique avec les ions Mg^{++} .

1 - 1 - 5 - fluorométriques : inspirée des travaux de SCHACHTER (146) adaptée à l'analyse automatique avec dialyse par KLEIN et OKLANDER (80). Le réactif utilisé est l'acide hydroxy 8 quinoline sulfonique.

Toutes ces méthodes fournissent en général des résultats comparables ; leur précision, en général moyenne, dépendant soit du degré d'insolubilité du précipité, soit de la spécificité des réactions de complexation ou de coloration. D'une manière générale, elles exigent toutes une déprotéinisation préalable, sinon une minéralisation. Elles s'appliquent difficilement aux micro-prélèvements exigés par l'expérimentation animale.

1 - 2 - Spectrophotométrie d'absorption atomique :

Les méthodes spectrographiques n'ont pas connu grand succès avant l'application analytique de l'absorption atomique. En effet, l'émission dans les flammes classiques est limitée à celle de bandes d'oxydes, très variables selon l'environnement chimique. La raie de résonance ne possède une intensité suffisante que pour des concentrations et des températures élevées difficilement conciliables avec les exigences des laboratoires de biologie.

La spectrophotométrie d'absorption atomique représente pour le magnésium une méthode d'analyse à la fois :

- . sensible
- . précise
- . applicable aux micro-échantillons
- . ne nécessitant ni déprotéinisation, ni minéralisation

préalables.

L'ensemble de ces qualités lui confèrent donc un intérêt

essentiel pour la réalisation des problèmes posés par l'étude expérimentale du métabolisme magnésien.

La technique est utilisée couramment dans le laboratoire du Professeur GIRARD depuis 1964 et F. ROUSSELET lui a consacré sa thèse (1966) (144). Nous ne ferons qu'en rappler le principe et sa modalité d'application au dosage du magnésium et du calcium en soulignant les points essentiels et les détails expérimentaux propres à notre travail.

1 - 2 - 1 - Principe :

Les atomes à l'état fondamental sont capables d'absorber certaines radiations (raies de résonance) qu'ils émettent lorsqu'ils sont excités. C'est le phénomène du renversement des raies spectrales explicité par la théorie de KIRCHHOFF. Dans les flammes, les atomes à l'état fondamental, donc capables d'absorber, sont beaucoup plus nombreux que les atomes excités, responsables des phénomènes d'émission. La spectrophotométrie d'absorption atomique se montre donc, en règle générale, plus sensible que la spectrophotométrie d'émission et les mesures apparaissent plus spécifiques.

Le magnésium représente l'un des exemples d'application où les conditions physiques et instrumentales se trouvent particulièrement favorables. :

- absorption atomique spécifique maximale (absorption 1 % pour une concentration ne dépassant pas 0,01 µg de Mg/ml)
- émission des lampes à 285,2 nm stable et intense.
- fond continu d'absorption de flamme relativement faible
- interférences chimiques limitées.

Comme tous les métaux présentant deux électrons sur la couche périphérique, la raie de résonance émise est unique et traduit le passage d'un des électrons optiques 3s sur la sous-couche 3p. Dans le cas du magnésium, elle se trouve parfaitement isolée dans une zone favorable du spectre (285,21 nm).

1 - 2 - 2 - Lampe au magnésium : les lampes à cathode creuse de magnésium présentent généralement une émission intense et stable, après préchauffage de la cathode d'un quart d'heure environ. Dans toutes les expériences, nous avons utilisé une lampe à cathode mixte de Ca et de Mg remplie de néon ; l'intensité du courant ne doit pas dépasser 15 mA et, de toute façon, être réglée au minimum indispensable pour produire l'énergie nécessaire au bon fonctionnement de l'appareil ; en effet, la sensibilité des mesures décroît avec l'augmentation du courant d'excitation.

1 - 2 - 3 - Flamme :

Alors que l'émission de la raie de résonance ($\lambda = 285,2 \text{ nm}$) nécessite des flammes de haute énergie (oxycyanogène) pour devenir utilisable, l'absorption peut se produire à la température modérée air/butane ou mieux, air/acétylène. Cependant, les flammes chaudes sont préférées du fait de la réduction des interactions d'origine chimique avec l'élévation de la température. Le caractère oxydant ou réducteur de la flamme intervient assez peu pour cet élément.

1 - 2 - 4 - Le brûleur est refroidi par un courant d'eau pour éviter la carbonisation de matières organiques risquant d'obturer la fente du brûleur.

1 - 2 - 5 - Interactions rencontrées dans les milieux biologiques :

L'interaction due aux phosphates, étudiée par WILLIS (185) reste faible dans les flammes chaudes et peut être corrigée comme l'effet dépresseur dû aux protéines par addition aux solutions de chlorure de strontium ou de chlorure de lanthane. Les expériences réalisées par F. ROUSSELET (144) ont montré que les interactions minérales restent faibles dans la flamme air/acétylène et que l'addition de chlorure de strontium ne présente que peu d'intérêt. Par contre, dans la flammes air/butane, ce réactif provoque une augmentation importante du facteur d'absorption.

1 - 2 - 6 - Méthode utilisée :

a) Les solutions étalons sont obtenues par dilution d'une

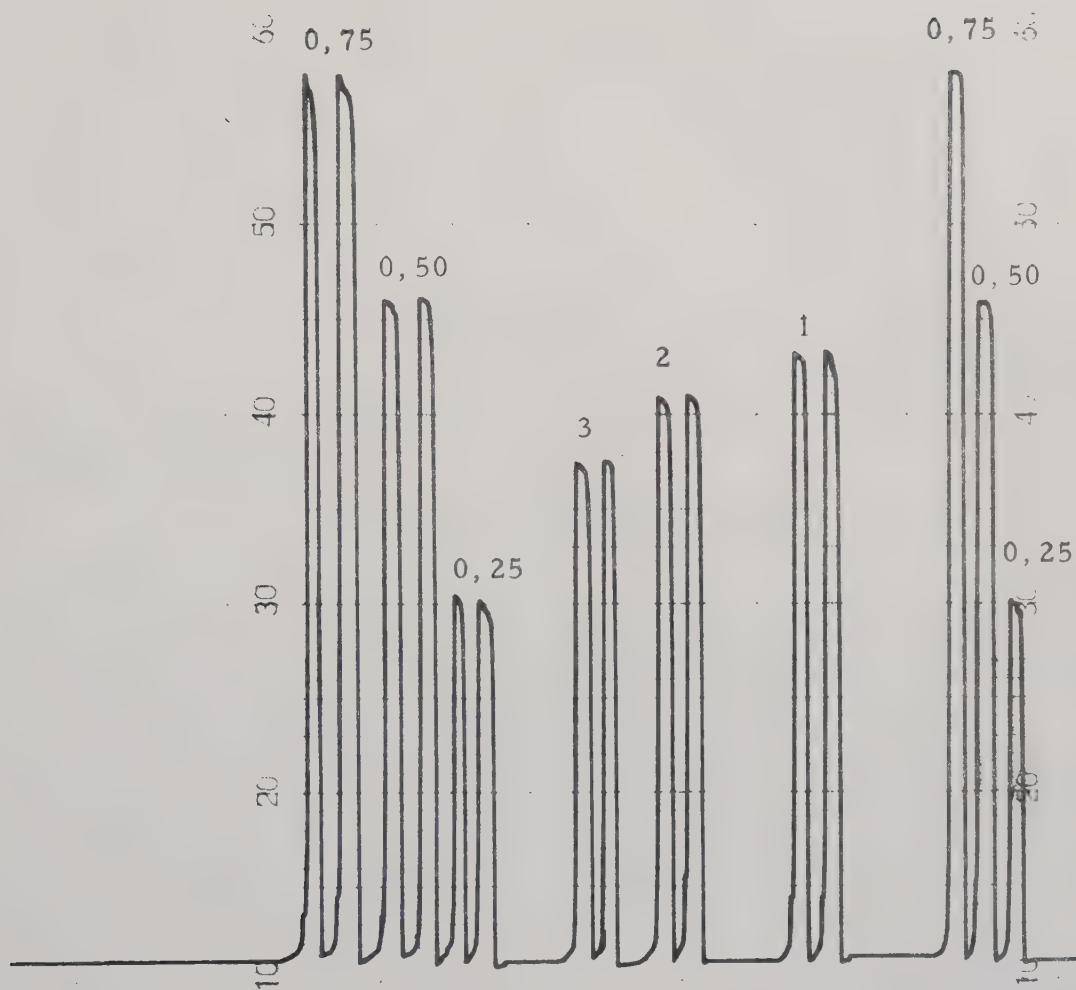


Figure 1
EXEMPLES DE DOSAGE DE Mg DE SERUM DILUE
AU 1/50è.

solution mère dosée à 100 $\mu\text{g/ml}$ et préparée par dissolution du magnésium métallique pur dans une quantité juste suffisante d'acide chlorhydrique. Nous préférons le métal au sel "pour analyses", chlorure ou sulfate, en raison de l'état d'hydratation toujours incertain de ceux-ci. La sensibilité de l'appareillage permet d'utiliser la gamme d'étalonnage 0,25 - 0,50 - 0,75 $\mu\text{g/ml}$.

b) Sérum ou plasma :

Ils sont dilués au 1/50^e dans une solution de LaCl_3 à 0,5 %, utilisée également pour le dosage du calcium, et dont la composition est donnée à propos de cet élément.

c) Magnésium érythrocytaire :

Le dosage s'effectue sans déprotéinisation ni minéralisation préalable ; en réalisant une dilution à 1 pour 100, l'hémolyse est accélérée par addition de saponine (concentration finale $2 \cdot 10^{-5}$; la saponine "purissime" commerciale doit être débarrassée du Mg qu'elle contient par passage sur résine Amberlite IR 120). L'effet dépresseur de l'hémoglobine étudié par F. ROUSSELET est réduit à une très faible valeur par addition de lanthane.

d) Magnésium tissulaire : les solutions obtenues après minéralisation, selon le procédé décrit plus loin, sont diluées avec le même tampon spectral.

2 - DOSAGE DE CALCIUM

Les techniques analytiques permettant le dosage de cet élément alcalino-terreux sont extrêmement nombreuses. Nous ne ferons que décrire la technique par absorption atomique que nous avons utilisée. Celle-ci donne, avec plus de précision et une grande rapidité, des résultats comparables à ceux des méthodes chimiques.

La raie de résonance principale de longueur d'onde $\lambda = 428,30 \text{ nm}$ revient à la transition $4s^2 \longrightarrow 4s 4p^2$. Cette raie se trouve dans une

région du spectre où l'absorption par l'atmosphère et les flammes reste faible. L'absorption atomique due au calcium sans atteindre l'importance de celle du magnésium, reste suffisamment forte pour permettre d'opérer sur des concentrations de l'ordre de 1.10^{-6} .

2 - 1 - Lampe au Ca

Nous utilisons la lampe mixte de Ca et de Mg. Le Ca présente une émission intense mais moins stable que celle due au Mg. L'énergie émise croît progressivement pendant la demi-heure qui suit la mise sous tension, puis décroît lentement au cours des heures suivantes. L'absorption spécifique semble peu influencée par l'intensité du courant traversant la lampe ; 15 mA semblent assurer une bonne émission et une durée assez longue d'utilisation de la lampe.

REMARQUE : Les lampes mixtes de Ca et de Mg, présentent l'avantage d'éviter le temps de préchauffage de deux lampes.

2 - 2 - Flamme :

L'absorption atomique spécifique du Ca dépend beaucoup de la nature et du réglage de la flamme. Le calcium s'oxyde très rapidement en donnant des composés Ca O et Ca O (H) extrêmement stables jusqu'à une température élevée. Il n'existe donc qu'un intervalle de temps très court entre le moment où le sel calcique introduit dans la flamme, subit la thermolyse et celui où l'oxyde se trouve formé. Ce phénomène explique les variations du taux d'absorption en fonction du caractère plus ou moins oxydant de la flamme ou de la zone traversée par le faisceau lumineux et motive l'emploi de manodétendeurs de précision pour maintenir les proportions respectives des gaz comburant et carburant constantes.

Par ailleurs, il convient d'utiliser des flammes assez chaudes ; le mélange air/acétylène se montre en pratique satisfaisant.

2 - 3 - Interactions rencontrées dans les milieux biologiques

Elles semblent relativement importantes dans le cas du

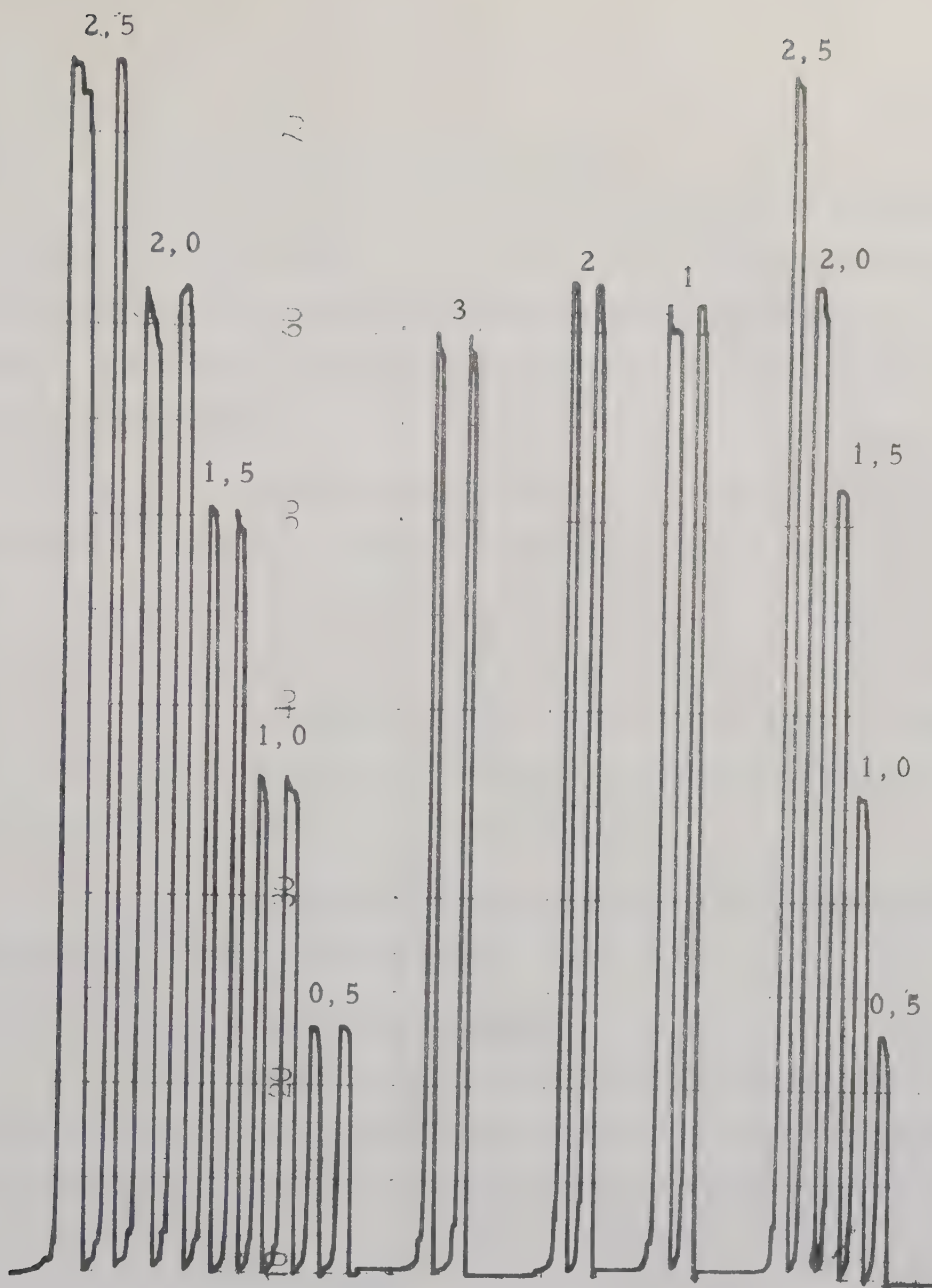


Figure 2
EXEMPLES DE DOSAGE DE Ca DE SERUM DILUE
AU 1/50^e

calcium.

Le calcium forme des combinaisons très stables avec les phosphates (comme avec les silicates) dont l'effet dépresseur sur l'absorption spécifique du calcium peut être corrigé par l'apport d'un tampon spectral : le lanthane (185) comme les autres terres rares, déplace le calcium des phosphates.

Les ions alcalins provoquent une augmentation apparente du taux d'absorption du calcium en diminuant le taux d'ionisation de celui-ci. Entre certaines limites, ces interactions sont constantes, donc les variations éventuelles des concentrations en ions alcalins dans le sérum ont une influence négligeable aux dilutions réalisées (1/50^e), si on prend soin d'effectuer celles-ci avec des liquides contenant des quantités importantes de sodium et de potassium (185).

L'effet dépresseur des protéines reste sans importance pratique si leur taux reste inférieur à 2 g/l.

2 - 4 - Méthode proposée :

Il convient d'augmenter le taux de dilution des liquides biologiques pour réduire l'effet dépresseur des protéines ; quant aux interactions minérales, elles sont corrigées par l'emploi du liquide de dilution :

Chlorure de sodium.....	1 g
Chlorure de potassium.....	0,20 g
Chlorure de lanthane.....	5 g
Eau bidistillée q. s. p.....	1 litre

La gamme d'étalonnage est préparée par dilution, dans le même liquide, d'une solution stock dosée à 100 µg/ml (250 mg de Ca CO₃/l en solution légèrement chlorhydrique), de façon à obtenir 0,50 - 1,00 - 1,50 - 2,00 - 2,50 µg/ml.

Le sérum ou le plasma sont dilués au 1/50^e avec le liquide cité.

Pour les organes, les dilutions sont réalisées avec le surnageant des minéralisats obtenus par voie humide.

3 - APPLICATION PARTICULIERE AUX TISSUS

Les métaux entrent le plus souvent en combinaison avec les substances organiques constituant la trame du tissu animal et leur mise en solution est une condition indispensable pour leur dosage par spectrophotométrie d'absorption atomique comme d'ailleurs par la plupart des techniques de chimie analytique.

Aux méthodes de calcination sulfonitrique préconisées par E. BERMAN (10) ou de la calcination à 550 ° C de H. E. PARKER (121), nous avons préféré la digestion nitroperchlorique proposée par M. L. GIRARD et F. ROUSSELET (47).

L'organe frais ou une fraction de cet organe, poids maximum 1 g, est traité dans une fiole conique par 1 ml d'acide nitrique et 1 ml d'acide perchlorique, étendus de 10 ml d'eau. L'ensemble est placé sur une rampe chauffante munie d'un système d'agitation magnétique et porté à l'ébullition. Il faut éviter soigneusement la dessiccation du milieu celle-ci pouvant provoquer une explosion. Avec cette technique, on parvient à une extraction complète du calcium et du magnésium en une dizaine de minutes pour 1 g de tissu.

Le produit de la digestion, coloré en jaune, est complété à 50 ml avec de l'eau bidistillée. On procède alors à une centrifugation pour éliminer les matières restées insolubles.

Le surnageant est dilué avec la solution de lanthane à 5°/‰ à un taux variant selon la richesse du prélèvement de façon à avoir une teneur finale en :

- . Mg comprise entre 0 et 0,75 µg/ml
- . Ca comprise entre 0 et 2,5 µg/ml

Le résultat final est exprimé en mg d'élément pour 100 g de tissu frais.

DEUXIEME CHAPITRE

ESSAI DE DETERMINATION DES DIFFERENTS ETATS PHYSICO-CHIMIQUES DU MAGNESIUM ET DU CALCIUM DANS LE SERUM SANGUIN

INTRODUCTION

On admet classiquement que le magnésium et le calcium existent dans le plasma sous trois états : liés aux protéines, -complexés, -ionisés ; les deux derniers étant définis aussi comme "diffusibles ou ultra-filtrables". La forme ionisée est généralement considérée comme la plus active physiologiquement et, de ce fait, sa détermination semble revêtir une grande importance à la fois théorique et pratique.

Dès 1867, JOLYET et CAHOUS avaient constaté que la paralysie des mouvements volontaires et réflexes, observée lors de la surcharge en magnésium, s'accompagnait d'une conservation de l'excitation musculaire alors que l'excitation du nerf moteur n'entraînait plus de contraction musculaire. L'étude plus approfondie de la physiologie neuromusculaire et de la pharmacologie ont permis de préciser que les ions calcium et magnésium interviennent dans les transmissions synaptiques et dans la stabilisation des membranes cellulaires. L'augmentation de la concentration de l'un quelconque de ces ions réduit l'excitabilité de la fibre musculaire et de la fibre nerveuse, diminue la sensibilité de la plaque motrice à l'acétylcholine mais, par contre, élève la transmission synaptique dans le cas du calcium, et l'abaisse en ce qui concerne l'ion magnésium.

DEL CASTILLO et EUGBAEK (34) attribuent cet antagonisme calcium-magnésium, à une différence de comportement à l'égard de la libération de l'acétylcholine par les terminaisons nerveuses, libération qui se trouve inhibée par Mg^{++} et accentuée grâce à Ca^{++} .

Comme les variations des teneurs plasmatiques en calcium et en magnésium ionisés affectent les fonctions du cerveau, on considère que

certaines maladies mentales primaires pourraient résulter de concentrations anormales de ces ions.

On comprend, par suite, tout l'intérêt que présenterait une méthode sélective et pratique de détermination des trois états plasmatiques du calcium et du magnésium.

1 - Plusieurs techniques ont déjà été préconisées pour analyser les formes diffusibles :

- ultracentrifugation simple (119)
- ultrafiltration accélérée par centrifugation (165)
- filtration à travers un gel (94)
- dialyse

2 - D'autres auteurs cherchant à évaluer les formes ionisées, font appel à l'activité co-enzymatique des deux éléments, par exemple :

- cinétique d'activité isocétrique déshydrogénase en présence de Mg^{++} (8)
- activité coagulante plasmatique du calcium ionisé

3 - On a encore proposé le développement d'une coloration spécifique avec la forme ionisée du calcium (96).

4 - Une solution idéale serait de disposer d'électrodes sensibles à la seule concentration en ion Mg^{++} ou en ion Ca^{++} , permettant ainsi d'effectuer des mesures potentiométriques très précises traduisant l'activité de ces ions. Actuellement, la sensibilité d'une telle mesure avec les électrodes dont on dispose pour le Ca^{++} , semble encore insuffisante pour apprécier les variations observées en physiopathologie. De plus, il n'existe pas encore d'électrode sensible au Mg^{++} . Par suite, nous n'avons pu nous attacher à la méthode potentiométrique.

5 - Certains auteurs, postulant sur le fait que la fixation du Ca par les protéines dépend uniquement de leurs taux respectifs, ont proposé des normogrammes, pour la déduction du taux de Ca^{++} ; ces normogrammes

sont établis d'après les équations suivantes :

$$- \text{Ca}^{++} = \text{Ca total (mg/100 ml)} - 0,87 \times \text{Protéines totales (g/100ml)}$$

$$- \frac{\text{Ca}^{++}}{(\text{Ca Prot.})} \times (\text{Prot.}) = K \text{ où } K = 10^{-2,22} \pm 0,07 \text{ à } 25^\circ \text{ et pH} = 7,35$$

$$- \text{Ca}^{++} = 0,566 \text{ Alb} - 0,255 \text{ P} + 7 \text{ (PETERS et ELSERS EN)(127)}$$

D'une manière générale, les travaux concernant les méthodes précédemment citées, s'occupent beaucoup plus de l'étude du fractionnement des compartiments calciques que de ceux du magnésium.

L'objet principal de notre travail correspondant, au contraire, essentiellement à l'étude du magnésium, nous nous sommes attachés à des techniques permettant l'étude simultanée et comparative du comportement des deux cations et en particulier de leur interaction mutuelle. Pour ce faire, nous avons mis en oeuvre trois types de méthodes dont nous avons d'abord étudié les possibilités respectives, puis comparé les résultats fournis par chacune d'elles :

- a) ultrafiltration accélérée par centrifugation (technique de TORIBARA modifiée) ;
- b) filtration exclusion sur gel de Sephadex ;
- c) échange d'ions sur résine.

Cette dernière technique a déjà été utilisée pour le calcium par SCHIRARDIN et METAIS (148). Nous l'avons étendue à l'étude du magnésium et nous avons examiné la signification d'éventuelles modifications de stabilité des liaisons métal-protéine en présence d'agents complexants comme le citrate.

1 - ULTRAFILTRATION ACCELEREE PAR CENTRIFUGATION

L'ultrafiltration à travers une membrane est venue récemment s'ajouter à la liste des méthodes de détermination du calcium et du magnésium diffusibles.

L'ultrafiltration représente une méthode pratique de séparation

en fonction de la masse moléculaire, et grâce à divers artifices permettant d'accélérer le phénomène, les dénaturations inévitables de substances biologiques fragiles restent modérées.

1 - 1 - Matériel :

TORIBARA a mis au point une technique très simple utilisant une membrane de cellophane pour séparer le calcium libre des constituants non ultrafiltrables du sérum. Le tube à centrifuger (figure 3), utilisé par cet auteur, comporte deux compartiments (a) et (b) séparés par une paroi poreuse (c) perpendiculaire à l'axe du tube ; la partie supérieure de celui-ci (a) peut recevoir un sac (d) de cellophane spéciale, dans lequel est introduit l'échantillon à analyser. Cet appareillage peut être relié à une source de carbogène. La pression dans les compartiments est équilibrée grâce à un tube latéral (e) qui les fait communiquer après le passage du mélange gazeux désiré ; l'ensemble ainsi obturé, permet de travailler en atmosphère contrôlée. Le dispositif est prêt à être centrifugé.

Les tubes proposés par TORIBARA ne sont malheureusement pas adaptés aux normes européennes et c'est pourquoi nous avons utilisé un dispositif légèrement différent. Ici, l'ultrafiltre est de forme conique (a), il possède une capacité de 7 ml en position verticale. Les membranes "centriflo" sont recommandées pour l'ultrafiltration de solutions renfermant des substances susceptibles d'être dénaturées par d'autres procédés de fractionnement (plasma - sérum - liquide céphalo-rachidien).

Les cônes CF 50 retiennent les substances de poids moléculaire supérieur à 50 000. Cette membrane s'insère à l'intérieur d'un support (b) conique en matière plastique non poreuse, avec un rebord à la partie supérieure et un petit orifice dans le fond permettant l'écoulement de l'ultrafiltrat. Le tout s'adapte à l'intérieur du tube de centrifugation (c), on peut utiliser des tubes gradués pour mesurer directement le volume recueilli (figure 4).

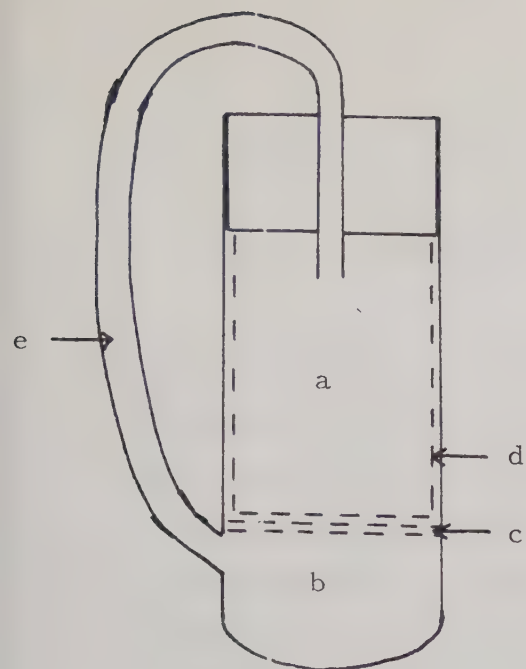


Figure 3

Tube de TORIBARA

- a. compartiment supérieur
- b. compartiment inférieur
- c. paroi poreuse
- d. sac en cellophane
- e. tube latéral

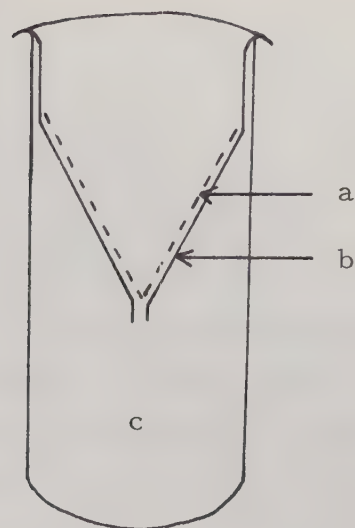


Figure 4

Dispositif "Centriflo"

- a. ultrafiltre
- b. support en plastique
- c. tube de centrifugation

1 - 2 - Mode opératoire :

Les trois parties de l'appareillage décrit, réunies, sont placées dans une centrifugeuse thermo-régulée dans laquelle il est possible de maintenir une atmosphère gazeuse contrôlée. La force centrifuge accélère la séparation des substances en fonction du poids moléculaire.

Les expériences ont été réalisées sur des sérums de sujets normaux, le sang étant recueilli sous huile de paraffine pour réduire les échanges gazeux.

Quatre millilitres du sérum sont mis à centrifuger dans ces cônes à une vitesse de 2 800 T/minute pour un rayon de 10 cm, dans une atmosphère de carbogène (5 % CO_2 + 95 % O_2 à, à 37° C, pendant 10 minutes). Le volume d'ultrafiltrat recueilli à partir des différents prélèvements

est de $0,40 \text{ ml} \pm 0,05$.

1 - 3 - Résultats :

1 - 3 - 1 - Nous avons réalisé 11 essais sur des sérums à l'état pur dans les conditions citées plus haut. Les résultats des dosages de Mg et de Ca dans le sérum et dans l'ultrafiltrat sont reportés dans les colonnes 3 et 5 pour le Mg, 7 et 9 pour le Ca du tableau I. Pour établir le rapport de la forme ultrafiltrante au taux total de chaque élément, il convient de tenir compte du volume occupé par les protéines et ramener les concentrations totales en Ca et en Mg à l'eau sérique ; nous avons dû multiplier les valeurs obtenues par 1,05, facteur déduit du taux de sodium et de potassium (éléments entièrement ultrafiltrables) dans le sérum et l'ultrafiltrat.

Dans ces conditions, les pourcentages obtenus de la fraction ultrafiltrable par rapport au taux total, vont de :

- 70 - 76 % pour le Mg

- 57 - 64 % pour le Ca

avec une moyenne de l'ultrafiltrable de :

- 15,0 mg/l d'eau sérique pour le Mg avec un écart type de 0,37 et un écart type à la moyenne de 0,12.

- 61,6 mg/l d'eau sérique pour le Ca

$$\sigma = 1,11 \quad - \quad \sigma_M = 0,36$$

Il est possible de déduire respectivement les taux de Mg et de Ca fixés (f) par gramme de protéine, d'après la formule :

$$f = \frac{C_i - C_u}{C_p}$$

C_i = concentration de l'élément dans la solution initiale

C_u = concentration de l'élément dans l'ultrafiltrat

C_p = concentration de protéine

TABLEAU I

RESULTATS OBTENUS (protéine - Mg - Ca) AVANT ET APRES ULTRAFILTRATION DE

11 SERUMS

	Protides g/l	magnésium (mg/l)				calcium (mg/l)			
		Total	Total x 1,05	ultraf	ultraf x 100 Total	Total	Total x 1,05	ultraf	ultraf x 100 Total
1	62,5	17,5	18,5	14	75,5	95	99,5	60,0	60,5
2	69	19,0	20,0	14,8	74	100	105	65,5	62,5
3	67	18,0	19,0	14,5	76	95	99,5	62,5	63
4	67,5	19,5	20,5	15	73	96	100,5	61,5	61
5	62	20,0	21,0	15	71	100	105	66,0	62,5
6	65	21,5	22,5	16,5	73	97	101,75	61,0	60,0
7	65	20,75	21,75	16,5	76	90	94,5	61,0	64,5
8	66	20,5	21,50	14,5	67,5	102	107	60,0	57,0
9	65	21,25	22,25	15,6	70	97,5	10,25	61,0	59,5
10	64	19,75	20,75	14,4	69,5	96	100,5	59,0	58,5
11	67,5	19,75	20,75	14,7	71	95	99,5	61,0	61,5
Moyenne	65,5		20,75	15,0	71,5		101,5	61,6	60,8
Ecart type	0,89		0,47	0,37	1,13		1,96	1,11	0,88
Ecart type à la moyenne	0,30		0,16	0,12	0,37		0,64	0,36	0,30

Nous obtenons pour le magnésium une valeur moyenne de 0,09 mg/g de protéine, et pour le calcium 0,60 mg/g de protéine.

1 - 3 - 2 - Dans un deuxième temps, nous avons procédé à plusieurs centrifugations fractionnées de 10 mn, sur quatre prélèvements dans des tubes différents. Les résultats des dosages de protéines sériques, de Ca et de Mg dans le sérum et les différents ultrafiltrats, sont reportés dans le tableau II.

On constate que, même en tenant compte des précisions expérimentales des mesures, les taux de magnésium et de calcium dans l'ultrafiltrat diminuent régulièrement : cette notion apparaît contradictoire avec la notion de deux compartiments nettement séparés et indépendants : ultrafiltrable et protéique.

Par contre, si on postule que les liaisons entre magnésium ou calcium (M) et les protéines (P) sont régies par la loi d'action de masse :

$$\frac{(M^{++})(P)}{(MP)} = K,$$

on observe bien qu'à toute augmentation de la concentration en protéines (P), doit correspondre une augmentation de (MP). Or, dans le compartiment supérieur de l'ultrafiltre, la concentration en protéines augmente régulièrement au cours de l'opération ; il devient donc tout à fait normal, dans le cadre de l'hypothèse exprimée, d'observer une diminution de la concentration en magnésium et en calcium dans l'ultrafiltrat.

1 - 4 - Mise en évidence de la fragilité des liaisons protéine-métal :

Diverses constatations laissent supposer que les liaisons contrac-

TABLEAU II

VOLUME (ml), Mg et Ca (mg/l) DE TROIS ULTRAFILTRATS OBTENUS PAR TROIS CENTRIFUGATIONS SUCCESSIVES SUR CHAQUE PRELEVEMENT

N°	Protéines g/l	Total		Total x 1,05		1 ^è centrifugation			2 ^è centrifugation			3 ^è centrifugation		
		Mg	Ca	Mg	Ca	Vol ml	Mg	Ca	Vol ml	Mg	Ca	Vol ml	Mg	Ca
1	62	20	100	21,0	105	0,45	15,0	66	0,40	15,0	58	0,35	14,0	55
2	65	21,5	97	22,6	102	0,35	16,0	61	0,35	15,0	55	0,30	14,5	50
3	65	20,75	90	21,8	95	0,40	16,5	61	0,35	15,5	53	0,30	14,0	50
4	66	20,50	102	21,5	107	0,45	15,0	60	0,35	14,5	58	0,30	14,0	55

tées entre le calcium ou le magnésium et les protéines sont très fragiles et dépendent étroitement de l'intégrité des structures secondaires et tertiaires et éventuellement quaternaires de ces dernières. Il nous a semblé intéressant d'étudier par la technique d'ultrafiltration accélérée décrite, l'influence de la simple dilution du sérum sans variation de la force ionique. Dans ces conditions, on pourrait espérer que l'hydratation des molécules protéiques resterait sensiblement constante.

Les expériences ont été effectuées sur quatre pools de sérums ; sur chaque pool, nous avons réalisé respectivement les dilutions au 1/4 et au 1/10 avec une solution isotonique de Na Cl.

Nous avons vérifié que le pH de départ du sérum a été conservé dans les dilutions.

Enfin, nous avons procédé à l'ultrafiltration accélérée par centrifugation de 10 mn (2 800 T/mn, rayon 10 cm) des sérums initiaux et des dilutions préparées.

Les résultats des dosages de Mg et de Ca dans le sérum et les différents ultrafiltrats sont consignés dans le tableau III .

TABLEAU III
RESULTATS DE L'EFFET DE LA DILUTION SUR LE TAUX D'ULTRA-
FILTRABLE DE Mg ET DE Ca (mg/litre)

N° du sérum	magnésium (mg/l)				calcium (mg/l)			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Sérum initial	21,25	19,75	19,75	19,75	97,5	100	96	95
ultrafiltrat du sérum	15,6	15,5	14,4	14,7	61	65	59	61
ultrafiltrat du sérum dilué au 1/4	17,2	16,0	15,6	16	69	70	66,5	68,5
ultrafiltrat du sérum dilué au 1/10	19,75	19,75	19,50	19,75	90	94	91	89

On constate que la dilution au 1/10 suffit à rendre diffusible la presque totalité du magnésium, tandis que pour le calcium, le pourcentage de métal ultrafiltrable passe en moyenne pour ces quatre expériences, de 62 % à 93 % ; il semble donc que les liaisons Mg-protéines sont encore plus labiles que les liaisons Ca-protéines.

Ces résultats confirment que la recherche de toute méthode d'estimation des différents états physico-chimiques du Mg dans les milieux biologiques exclut à priori toute variation de concentration et, d'une manière générale, toute manipulation pouvant provoquer une modification d'un équilibre particulièrement précaire.

1 - 5 - Effet de la surcharge en magnésium et en calcium in vitro sur le taux de l'ultrafiltrable de ces éléments

Nous avons surchargé des sérums en ions Ca^{++} et Mg^{++} , entièrement ultrafiltrables, en solution concentrée et à pH = 7, de façon à provoquer une augmentation de 38 mg/l en Ca et 30 mg/l en Mg.

Nous avons vérifié que cette manipulation n'a pas provoqué de modification du pH du sérum.

Après ultrafiltration, les résultats de dosage de Mg et de Ca (tableau IV) dans les sérums surchargés ou non et dans les ultrafiltrats, permettent de faire les constatations suivantes :

. tout le sel additionné n'a pas été retrouvé dans l'ultrafiltrat ; il s'en est fixé sur les protéines. Ce qui est conforme à la loi d'action de masse.

. le rapport Ultrafiltrable est maintenu constant pour le calcium, contrairement à ce qu'on ^{Total} observe pour le magnésium ; pour cet élément avec la forte surcharge, le rapport $\frac{\text{Mg ultrafiltrable}}{\text{Mg total}}$ diminue nettement.

REMARQUE : TORIBARA, TEREPKA et DEWEY avaient déjà observé que l'administration de calcium à des sujets, entraînait une augmentation proportionnelle de la forme liée et de la forme ultrafiltrable de cet élément (165).

TABLEAU IV
EFFETS DE LA SURCHARGE EN Mg^{++} ET EN Ca^{++} SUR LE TAUX
DE L'ULTRAFILTRABLE DE CES ELEMENTS

		magnésium (mg/l)			calcium (mg/l)		
		Total	ultraf.	$\frac{\text{ultraf.}}{\text{Total}} \times 100$	Total	ultraf.	$\frac{\text{ultraf.}}{\text{Total}} \times 100$
sérum	1	20,5	13,5	66,0	99	52,0	53,0
	2	20	13,5	67,5	94	51,0	54,0
sérum + Ca^{++}	1	20	13,5	67,5	138	75,0	54,5
	2	19,5	13,5	69,0	132	74,0	56,0
sérum + Mg^{++}	1	50	24,5	49,0	99	52,5	53,0
	2	50	24,0	48,0	94	52,0	55,0

La présence d'un excès de magnésium ne provoque pas un déplacement du calcium de ses sites protéiques et inversement. La compétition entre ces deux éléments ne semble donc pas jouer au niveau des sites protéiques du sérum.

Deux hypothèses sont possibles pour expliquer ce phénomène :

- . présence de sites protéiques disponibles en nombre important
- . ou différence entre les sites protéiques du calcium et ceux du magnésium.

1 - 6 - Influence du pH sur les liaisons métal-protéines

Sur deux pools de sérum, nous avons étudié l'effet de la va-

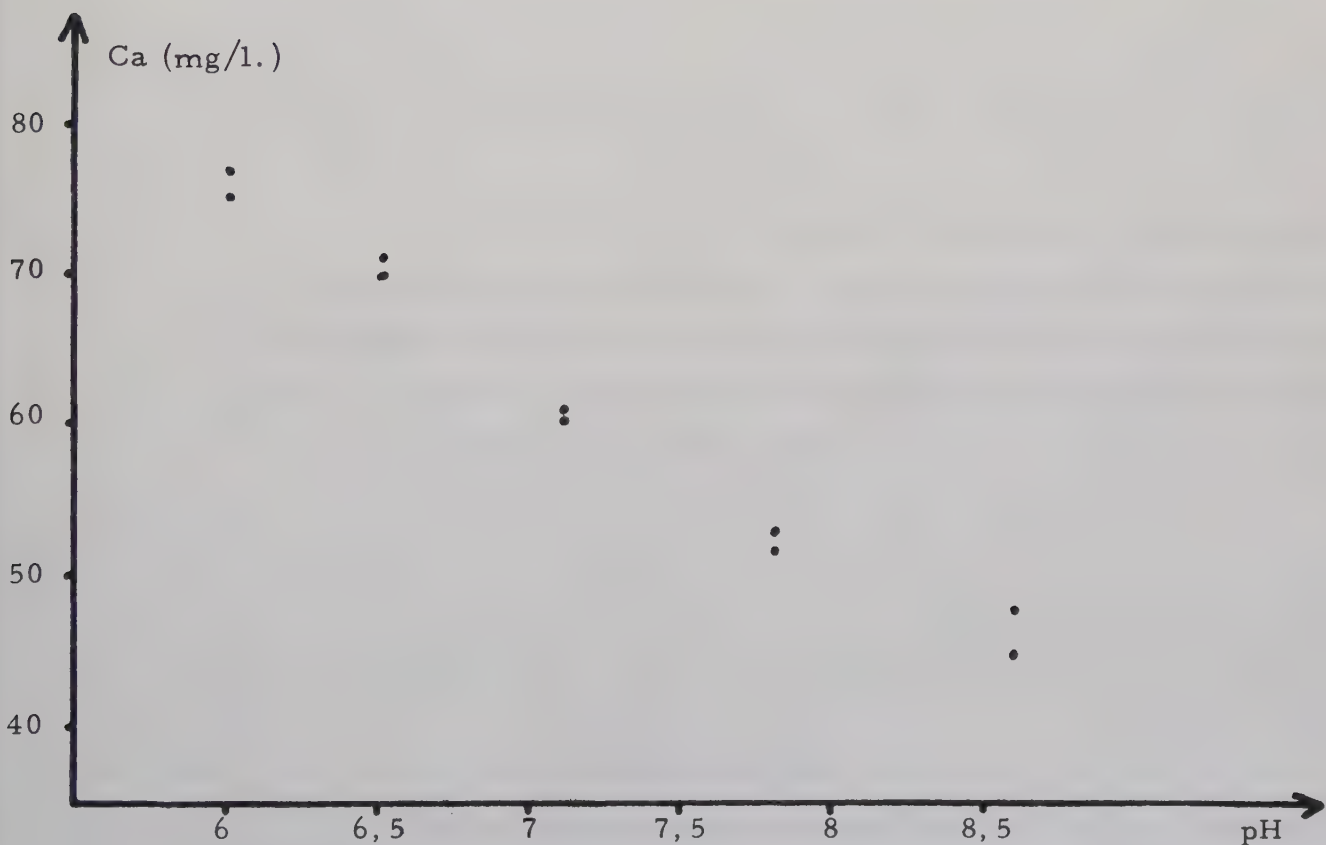
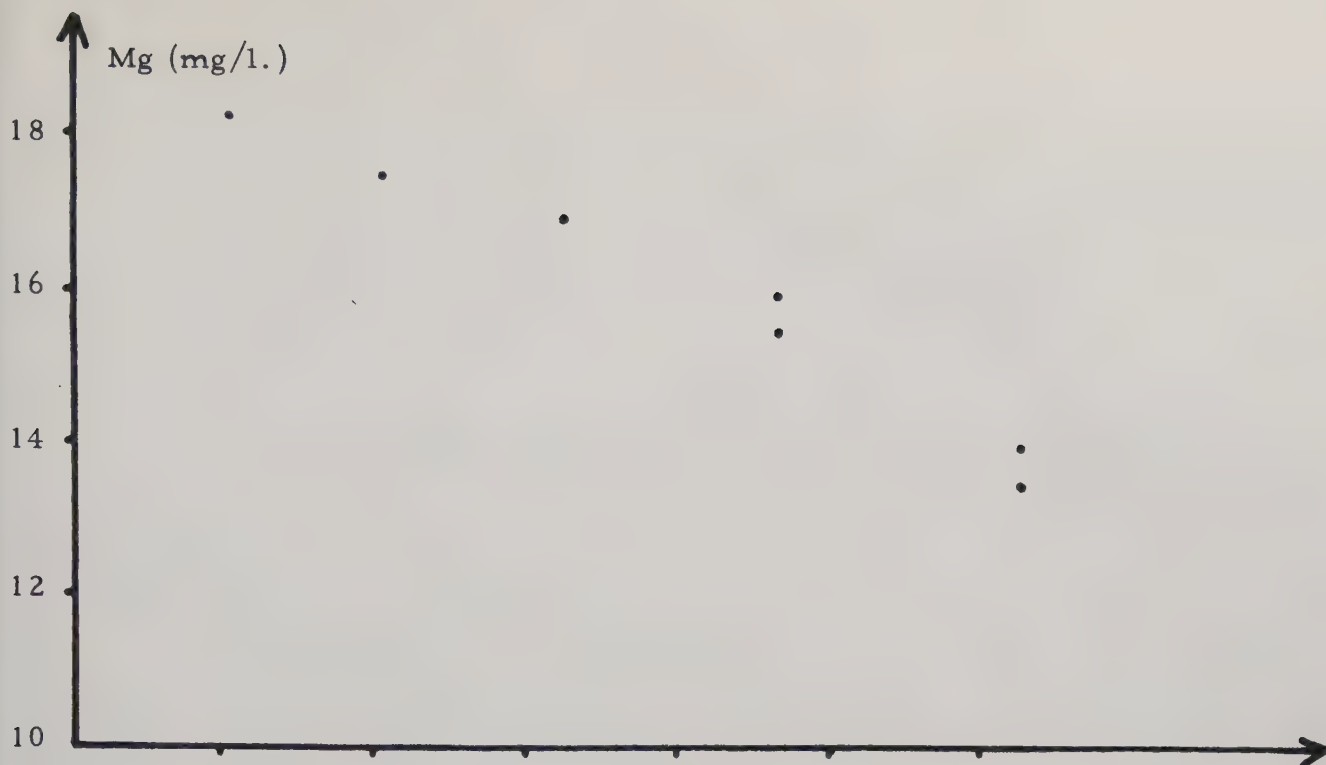


Figure 5
EFFET DU pH SUR LE TAUX
DE MAGNESIUM ET DE CALCIUM ULTRAFILTRABLES

riation du pH sur le taux de l'ultrafiltrable. Pour ceci, nous avons ajusté les pH à 6,0 - 6,5 - 7,1 - 7,8 - 8,6 par ajout ménagé d'acide chlorhydrique ou de soude. Les résultats obtenus, sont résumés dans le tableau V et sur la figure 5 .

TABLEAU V
INFLUENCE DU pH SUR LES TAUX DE L'ULTRAFILTRABLE

sérum n°	1				2			
	Mg (mg/l)		Ca (mg/l)		Mg (mg/l)		Ca (mg/l)	
pH	Total	ultraf.	Total	ultraf.	Total	ultraf.	Total	ultraf.
8,6	96,0	48,0	21,25	14,0	97,5	45,0	21,25	13,5
7,8	96,0	53,0	21,25	16,0	97,5	52,0	21,25	15,5
7,1	96,0	70,0	21,25	17,5	97,5	71,0	21,25	17,5
6,0	96,0	75,0	21,25	18,25	97,5	77,0	21,25	18,25

Des taux de Mg et de Ca dans l'ultrafiltrat obtenu avec des sérums ajustés à des pH différents, il ressort que les liaisons protéiques de ces éléments sont rompues au fur et à mesure que le pH du milieu diminue. le rapport de l'ultrafiltrable au taux initial augmente en moyenne de :

- 65 % à 85 % pour le Mg

- 48 % à 78 % pour le Ca

lorsque le pH baisse de 8,6 à 6,0.

Ces résultats permettent de souligner l'importance du maintien du pH physiologique pour l'appréciation du Mg et du Ca ultrafiltrables.

1 - 7 - Technique proposée:

Des constatations expérimentales (1 - 3 - 2), il ressort que la technique d'ultrafiltration qui entraîne nécessairement une concentration

du compartiment protéique, ne puisse être considérée comme satisfaisante, du moins si on se contente de doser le magnésium ou le calcium dans une seule fraction de l'ultrafiltrat.

Nous proposons une méthode d'approche plus précise de la réalité physiologique, basée sur l'extrapolation de la concentration en magnésium et en calcium de l'ultrafiltrat au temps 0 de l'opération.

La technique suivie : 5 ml de sérum fraîchement recueilli et à l'abri des échanges gazeux pour éviter les modifications de pH, sont placés dans l'ultrafiltre. On procède à trois centrifugations successives, dans un tube taré, de sorte que le poids de l'ultrafiltrat soit chaque fois aussi proche que possible de 0,50 g (conditions expérimentales, temps et vitesse de rotation, établies pour chaque centrifugeuse par des expériences préalables). L'opération est conduite à 37° C dans une atmosphère de carbogène. Des concentrations en calcium et en magnésium, déterminées grâce à la spectrophotométrie d'absorption atomique, on déduit par construction graphique les teneurs théoriques de l'ultrafiltrat au temps 0.

Les résultats trouvés par cette technique fournissent une moyenne de 75 % de Mg diffusible, moyenne comparable à celle des estimations de différents auteurs (tableau VI) et de 67% pour le Ca.

TABLEAU VI
RESULTATS OBTENUS PAR CERTAINS AUTEURS DE LA FORME
IONISEE ET ULTRAFILTRABLE DU Mg

Auteurs	Technique	Forme appréciée	Pourcentage
MAC LEOD (97)	Membrane échangeur	ionisée	80 - 85 %
FRIZEL et Coll. (45)	Echangeur d'ions	ionisée	80 %
BAUM et CZOK (8)	Activité catalytique	ionisée	60 - 100 %
AMES SAKANONE (4)	Ultrafiltration	ultrafiltrable	84 %
SILVERMAN et Coll. (152)	Ultrafiltration	ultrafiltrable	65,3 %
CUMMINGS et Coll. (33)	Sédimentation différentielle	ultrafiltrable	70 %

2 - FILTRATION SUR GEL SEPHADEX :

La chromatographie de filtration sur gel, encore connue sous le nom de chromatographie par tamisage moléculaire (69), permet de fractionner un mélange en fonction du poids moléculaire de ses constituants. Divers auteurs ont proposé d'autres dénominations, tels STERRE et ACKERS (160) : chromatographie de restriction à la diffusion, PEDERSEN (125) : chromatographie d'exclusion moléculaire.

2 - 1 - Principe :

La chromatographie sur Sephadex (macromolécule de dextrane) partage la phase liquide qui traverse ce dernier en deux parties : celle qui se déplace entre les grains pendant l'élution de la colonne et celle qui gonfle les grains et n'est accessible que par diffusion. Ainsi, les substances introduites au sommet de la colonne se partagent-elles entre les phases liquides intra- et extra-granulaires ; les molécules de dimensions supérieures aux plus gros pores du Sephadex gonflé, qui se trouvent par suite au-dessus de la limite d'exclusion, ne peuvent pénétrer dans les grains du gel ; elles traversent donc le gel dans la phase liquide circulante autour des grains et quittent la colonne les premières. Par contre, les molécules plus petites diffusent dans un volume plus grand de la phase stationnaire et sont plus lentement éluées que les grosses molécules.

Ainsi, les molécules quittent le gel Sephadex dans l'ordre décroissant des masses moléculaires, les plus grosses apparaissant après la sortie d'un certain volume éluant correspondant au volume mort de la colonne (volume de liquide extragranulaire, c'est-à-dire volume total de la colonne de chromatographie diminué du volume occupé par le gel).

Le principe de la filtration sur gel semble, à priori, répondre aux exigences de séparation des différentes formes physico-chimiques du Ca et du Mg, à condition qu'on tienne compte des effets de dilution inévitables.

La théorie du tamisage moléculaire, basée sur un modèle spatial,

permet de formuler l'hypothèse que la séparation des très petites molécules exige l'emploi d'un gel très fortement réticulé, le degré de réticulation conditionnant la porosité et l'indice de rétention d'eau.

La filtration sur gel permet des mesures quantitatives en l'absence de phénomène de rétention irréversible dans la colonne. L'analyse quantitative est effectuée, dans notre expérience, en enregistrant le taux de protéines contenues dans les fractions d'éluat recueillies à des intervalles de temps connus et réguliers. L'effluent est récupéré pour le dosage du calcium et du magnésium dans chaque fraction. On peut ainsi étudier la formation de complexes, et déterminer la constante d'équilibre de ceux-ci en comparant les courbes d'élution des réactants.

2 - 2 - Matériel utilisé :

Sephadex : G 25 médium

Dimensions des particules : 50 - 150 μ

Limite d'exclusion exprimée en poids moléculaire 5000

Coefficient d'absorption d'eau : $2,5 \pm 0,2$ g/l

Poids du gel : 40 g

Volume d'un gramme de gel gonflé : 5 ml

Volume du gel gonflé : 200 ml

Colonne : diamètre : 2,5 cm

hauteur : 45 cm

volume total : 205 cm³

volume mort : 76 ml

Solution à analyser : sérum humain

Liquide d'élution : Solution de NaCl à 9 g/l, renfermant ou non des quantités variables de magnésium et de calcium.

2 - 3 - Mode opératoire :

2 - 3 - 1 - Préparation de la colonne :

Mettre le gel à gonfler dans un excès d'eau, à la tem-

pérature du laboratoire, pendant 24 heures.

La colonne étant en position verticale, brancher sur l'orifice de sortie un tube capillaire d'une longueur à peu près égale à celle de la colonne. -Verser une faible quantité de liquide et obturer l'orifice de sortie. -Eliminer les bulles d'air emprisonnées sous le tamis en nylon par aspiration à l'aide d'une seringue fixée au tube de sortie. -Mélanger le gel gonflé avec le liquide pour chasser les bulles d'air et remplir la colonne avec le gel gonflé. -Placer l'extrémité du tube de sortie légèrement au-dessous du niveau du liquide dans la colonne, puis dégager l'ouverture pour permettre au solvant de s'écouler lentement. -Ajouter progressivement la totalité du gel, avant que les premières portions ne se soient complètement déposées pour assurer l'homogénéité de la colonne. -Faire circuler le liquide d'élution au travers de la colonne afin de tasser le gel.

2 - 3 - 2 - Déroulement de la chromatographie :

Une pompe péristaltique permet d'assurer l'introduction régulière de l'échantillon, puis la circulation du liquide d'élution en chromatographie descendante, sous un débit de 1,25 ml/min.

Le recueil des fractions se fait dans des godets placés sur un collecteur automatique, tournant à la vitesse de un godet toutes les deux minutes, chaque godet recueillant, par suite, 2,5 ml.

2 - 3 - 3 - Analyse des fractions :

Les protéines sont dosées spectrophotométriquement par la réaction du biuret, utilisant le réactif de GORNALL et BARDAWILL.

Le magnésium et le calcium sont évalués par spectrométrie d'absorption atomique. On procède à une dilution préalable par le tampon spectral au lanthane (voir technique), à un taux fonction de la concentration de ces éléments dans le liquide d'élution.

2 - 4 - Expériences et résultats :

Nous avons procédé à la chromatographie sur gel (Sephadex G 25 Medium) de sérum humain, en utilisant comme éluants des liquides isotoniques, certains dépourvus de magnésium et de calcium, d'autres renfermant des quantités variables de ces éléments dans un rapport identique ou non à celui du sérum.

En suivant le protocole opératoire décrit, nous obtenons les résultats suivants :

Les protéines apparaissent dans le liquide d'élution avec le volume mort de la colonne (76 ml, godet n° 31) et présentent :

- . une concentration maximale au niveau du godet n° 38 (96 ml).

- . une concentration pratiquement nulle dès le godet n° 50 (125 ml).

- le magnésium libre : - début godet n° 55 (138 ml)
 - maximum godet n° 62 (155 ml)
 - fin godet n° 82 (205 ml)
- le calcium libre : - début godet n° 68 (170 ml)
 - maximum godet n° 72 (180 ml)
 - fin godet n° 100 (250 ml)

Volumes d'élution : on observe ainsi que les maxima de concentration des protéines du magnésium et du calcium correspondent à des volumes d'élution respectivement égaux à :

- Protéines : 96 ml
- Magnésium : 155 ml
- Calcium : 180 ml

Volume de séparation : c'est le volume (V_{sep}) qui sépare le front descendant (v'') de la courbe d'élution d'une substance du front ascendant ($V'e$) d'une autre substance élue plus tard : $V_{sep} = V'e - V''e$. Cette grandeur

permet d'apprécier la marge de sécurité dont on dispose dans la séparation de deux substances. Dans notre expérience, il importe de s'assurer de la bonne séparation des protéines et des éléments minéraux. Des chiffres exprimés plus haut, nous pouvons déduire que le volume de séparation est :

- . pour protéines-calcium, de $170 - 125 = 45$ ml, soit 18 godets.
- . pour protéines-magnésium, de $138 - 125 = 13$ ml, soit 5 godets.

Ces valeurs apparaissent suffisantes pour le but proposé. En effet :

- on constate que, grâce à la faible porosité du gel choisi (G 25) et à l'emploi d'un liquide d'élution de force ionique suffisante pour empêcher la précipitation des euglobulines, les protéines sont éluées en bloc sous la forme d'un pic symétrique et relativement étroit.

- on observe, en outre, une séparation nette entre protéines et éléments minéraux libres et, en ce qui concerne ceux-ci, un décalage entre les volumes d'élution respectifs du magnésium et du calcium. Ce dernier phénomène est vraisemblablement dû à la différence des dimensions réelles respectives des ions solvatés, supérieures dans le cas du magnésium (124).

La chromatographie sur gel permet donc bien de séparer les protéines d'une part, les substances de faible poids moléculaire comme Mg^{++} et Ca^{++} , d'autre part.

Il devient dès lors possible d'étudier la répartition de ces deux métaux entre les deux formes : forme libre, retardée par le gel ; forme associée aux protéines, émergeant de la colonne avec le volume mort.

En faisant varier la composition du liquide d'élution, nous pensons pouvoir étudier l'équilibre éventuel entre ces deux formes.

2 - 4 - 1 - Filtration sur gel en milieu isotonique dépourvu de magnésium et de calcium :

Avec le liquide d'élution contenant seulement 9 g de NaCl/l, les courbes d'élution respectives des protéines du magnésium et du

calcium (figure 6) permettent de constater que les fractions protéiques ne renferment ni magnésium, ni calcium. Les liaisons protéines-métal se montrent donc fragiles, puisqu'elles se trouvent entièrement rompues dans les conditions opératoires utilisées ; celles-ci restant cependant assez proches de l'état physiologique, en ce qui concerne, du moins, la force ionique.

La mesure du pH des différentes fractions aliquotes recueillies permet toutefois de déceler des variations faibles d'un godet à l'autre, explicables par l'absence de tout système tampon surajouté. Les éléments minéraux assurant la constance du pH se trouvent, en effet, séparés des protéines durant la chromatographie : c'est pourquoi, nous avons renouvelé l'expérience précédente en mettant en oeuvre un tampon. Par mesure de sécurité supplémentaire, nous avons ajouté, en outre, un agent antiseptique, azide de sodium à 0,05°/., de façon à pouvoir différer l'analyse sans craindre l'apparition d'un développement microbien.

2 - 4 - 2 - Filtration sur gel en milieu isotonique tamponné dépourvu de magnésium et de calcium :

Le tampon utilisé est le "tris" 0,05 M de pH 7,40 identique à celui du sérum.

La mise en oeuvre de substance tampon et d'antiseptique introduit une difficulté nouvelle due à la présence de traces de Ca^{++} et de Mg^{++} dans ces réactifs ; c'est ainsi que le tris habituellement utilisé dans notre laboratoire (Merck n° 8382) renferme 0,3 g de Ca/kg et 0,03 g de Mg/kg. Il nous a fallu, par suite, recourir à du "tris" hautement purifié, (94 000 -7438, Tris Ultrapure, M.A. Serlabo) contenant encore, néanmoins, 0,12 g de Ca/kg mais pas de Mg. Les essais de purification par cristallisation répétée n'ont pas permis d'abaisser sensiblement la teneur en impurité. A la concentration de 0,05 M en "tris", l'apport en Ca^{++} s'élève encore à 0,70 mg/l, valeur toutefois suffisamment basse pour ne pas interférer dans les expériences effectuées.

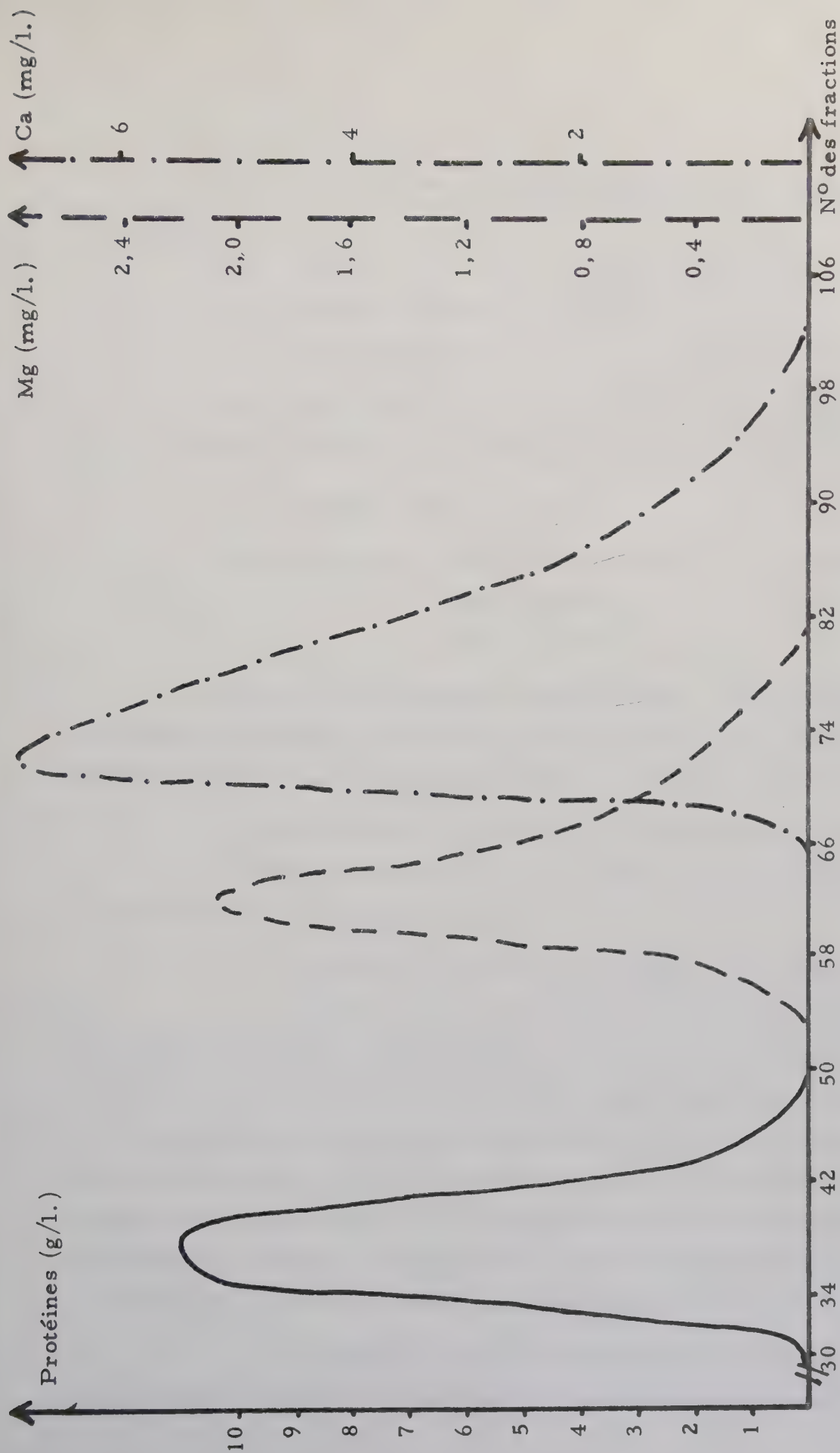


Figure 6

COUPES D'ELUTION DU SERUM (— PROTEINES, ---Mg, -.-Ca)
AVEC UNE SOLUTION DE NaCl A 9 °/oo

Le liquide d'élution est préparé à partir des solutions mères suivantes :

- a - "Tris"..... 60,5 g
 Azide de sodium.... 0,5 g
 Eau bidistillée q. s. p. 1 l.

Le pH étant ajusté à 7,40 avec HCl avant de ramener le volume à 1 l (approximativement 31 ml d'HCl concentré sont nécessaires).

- b - Solution de NaCl à 90 g/l

Liquide d'élution : Tampon Tris 0,5 M..... 100 ml
 NaCl 90 g/l..... 100 ml
 Eau bidistillée q. s. p.... 1 l.

Le protocole opératoire étant identique à celui de l'expérience précédente, le dosage des protéines, du magnésium et du calcium dans les différentes fractions conduisent aux mêmes résultats, c'est-à-dire :

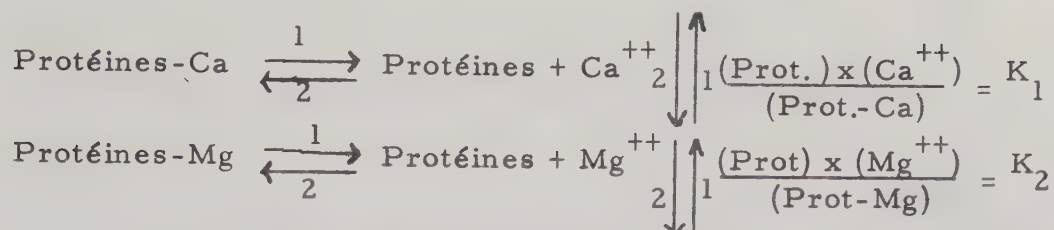
- . nette séparation des protéines et des éléments minéraux .
- . absence de magnésium et de calcium dans les fractions renfermant des protéines comme ci-dessus.

Les résultats sont donc identiques à ceux de la figure 6.

Durant la traversée de la colonne, où il y a diffusion par exclusion moléculaire, les complexes protéines-métaux avançant les premiers, se séparent des formes ionisées ; ils se trouvent, par suite, au contact du liquide d'élution dépourvu d'éléments ionisés. Il en résulte une rupture des liaisons protéines-M au profit de $(M^{++} + \text{protéines})$ (M étant le magnésium ou le calcium). M^{++} ainsi libéré se trouve retenu par le gel, ce qui déplace à nouveau l'équilibre dans le sens de la dissociation du complexe Protéines-M et la diminution de cette forme au profit de $(M^{++} + \text{protéines})$.

De proche en proche, on aboutit en fin de parcours à une disparition complète de la combinaison (protéines-M). On peut donc penser

que l'équilibre est régi par les relations suivantes :



Cette notion d'équilibre nous a conduit à utiliser des liquides d'élution contenant des concentrations variables de Mg^{++} et de Ca^{++} pour vérifier la réalité du phénomène.

Toutes les expériences suivantes sont conduites dans les mêmes conditions que précédemment, à l'exception de la composition de liquide d'élution dans laquelle figure cette fois du Mg^{++} ou du Ca^{++} , ou les deux.

Il est indispensable de s'assurer, pour chaque nouveau liquide mis en oeuvre, de l'équilibration de la colonne avec l'éluant en vérifiant l'identité de concentration en magnésium et en calcium à l'entrée et à la sortie de la colonne. On remarque que le temps nécessaire pour obtenir l'équilibre avec le magnésium est plus long que pour le calcium (environ 3 heures au rythme de 1,25 ml/min) ce qui semble confirmer la différence de comportement de ces deux ions, déjà mise en évidence sur les courbes de la figure 6.

2 - 4 - 3 - Filtration sur gel avec un liquide d'élution renfermant 2,4 mg/l de Mg^{++} ($5 \cdot 10^{-5}$ M) :

L'élution avec un liquide identique au précédent, mais renfermant en outre du magnésium permet d'observer l'apparition de la fraction (Prot-Mg) attendue, preuve que le magnésium reste partiellement lié aux protéines dans ces nouvelles conditions opératoires, comme le montre la figure 7.

Nous avons recherché quelle relation pouvait être établie entre le taux de magnésium fixé et la concentration en protéines de chaque fraction recueillie. La figure 8 représente la courbe obtenue en portant en abscisse le taux de protéines de chaque fraction de l'éluat et en or-

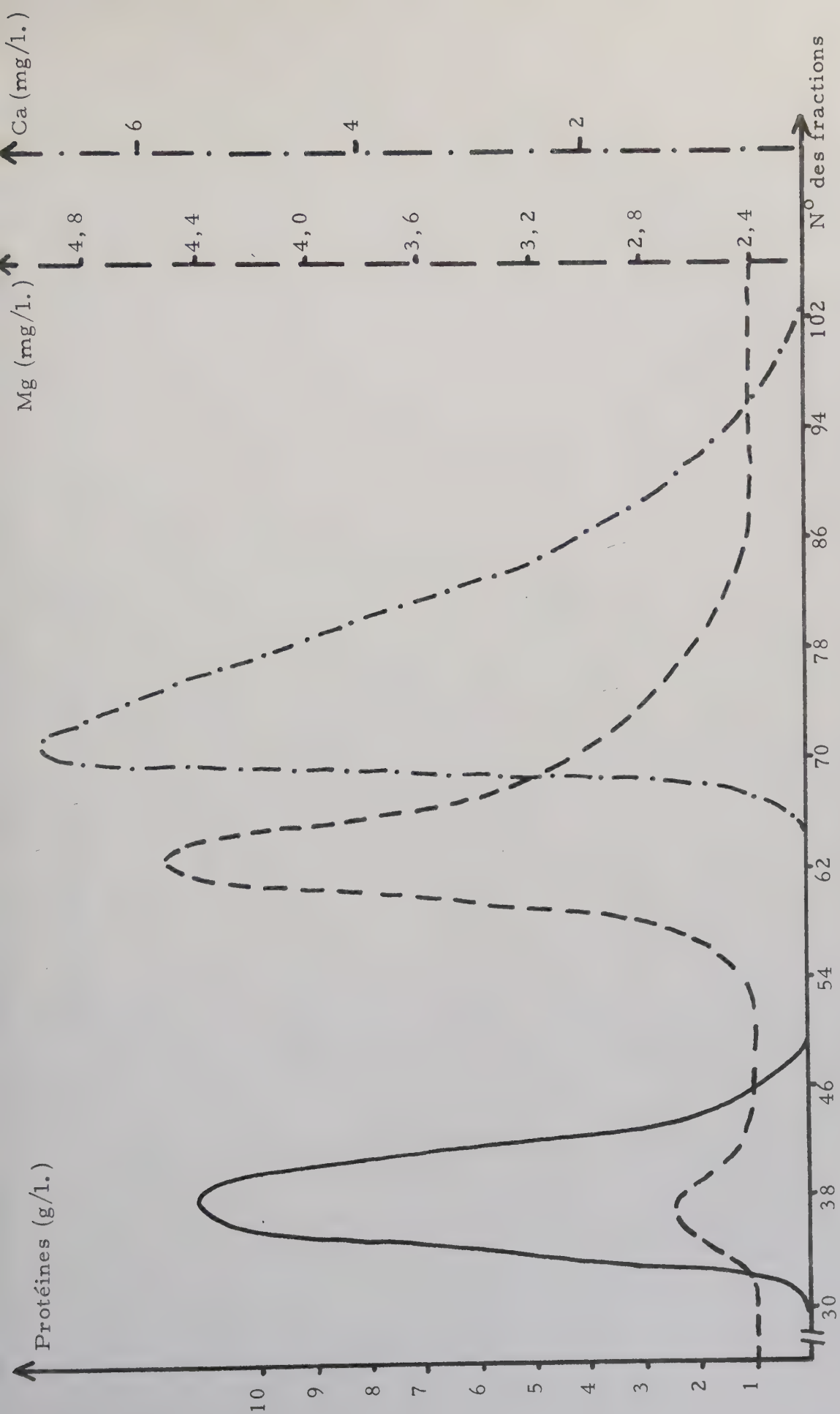


Figure 7

COURBES D'ELUTION DU SERUM (— PROTEINES, ---Mg, ---Ca)
 AVEC UN LIQUIDE RENFERMANT 2,4 mg/l. DE Mg

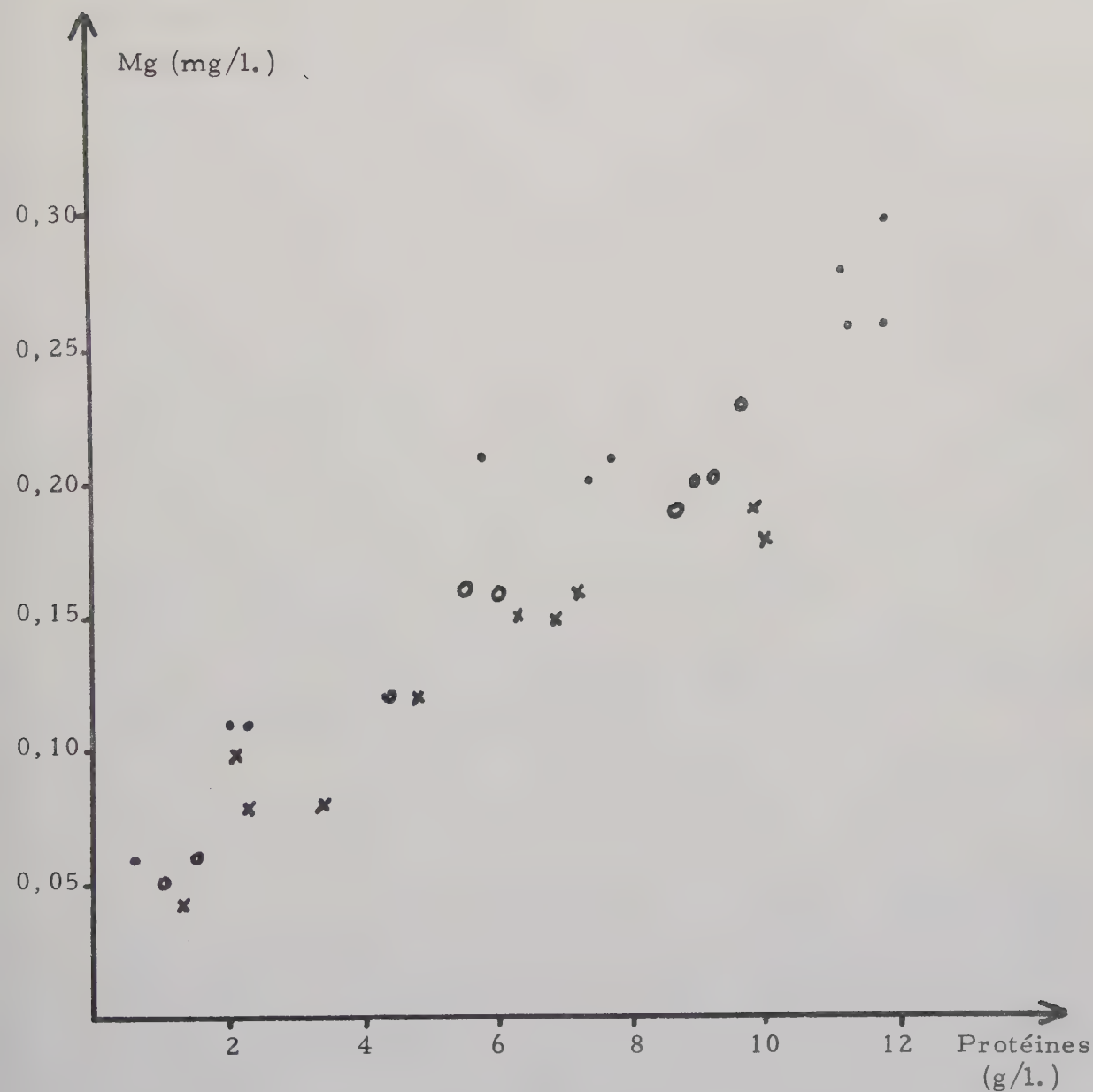


Figure 8

TAUX DE Mg EN FONCTION DE CELUI DES PROTEINES

ELUANT	4mg/l. Ca	2,4 mg/l. Mg +
	2mg/l. Ca	2,4 mg/l. Mg o
		2,4 mg/l. Mg .

donnée la concentration en magnésium correspondante. La courbe représentative est pratiquement linéaire, les quantités de magnésium liées augmentent proportionnellement aux concentrations protéiques. A la concentration de 2,4 mg/l de Mg d'éluant, le magnésium se révèle capable de saturer jusqu'à 10 g de protéines. La pente de la droite expérimentale obtenue permet de calculer la capacité maximale de fixation pour le métal envisagé. La valeur calculée d'après les données de la figure 8 pour le magnésium est voisine de 0,025 mg par gramme de protéines. En supposant que le taux de fixation conserve la même importance en milieu protéique dilué, la valeur précédente tend à montrer que les 70g de protéines normalement présentes par litre de sérum seraient susceptibles de fixer 1,75mg de Mg. Or les résultats fournis par les autres méthodes (0,1mg de Mg/g de protéines, soit 7mg pour 70g de protéines environ), s'avèrent supérieurs. Cette discordance nécessitait donc une étude supplémentaire.

2 - 4 - 4 : Filtration sur gel avec un éluant renfermant du calcium à la concentration de 4mg/l ($5 \cdot 10^{-5}$ M)

Là aussi, apparaît un nouveau pic de calcium au niveau des protéines (figure 9).

La courbe représentative du taux de calcium en fonction de celui des protéines permet de distinguer deux parties (figure 10): la première correspondant aux taux de protéines les plus faibles est de pente très forte, tandis que la seconde partie relative aux taux de protéines élevés s'infléchit par rapport à la première vers une parallèle à l'axe des abscisses. Il semble donc que, dans les conditions opératoires choisies, la présence de Ca^{++} dans le liquide d'élution favorise la formation du complexe (protéines-Ca). Pour les faibles concentrations protéiques, l'excès de Ca^{++} est suffisant pour saturer la totalité des sites de fixation des protéines. Pour les taux de protéines supérieurs à 2 g, le Ca^{++} de l'éluant se révèle insuffisant pour bloquer les sites disponibles et la pente de la courbe diminue.

La pente de la droite expérimentale correspondant à la capacité maximale de fixation du calcium sur les protéines semble se confon-

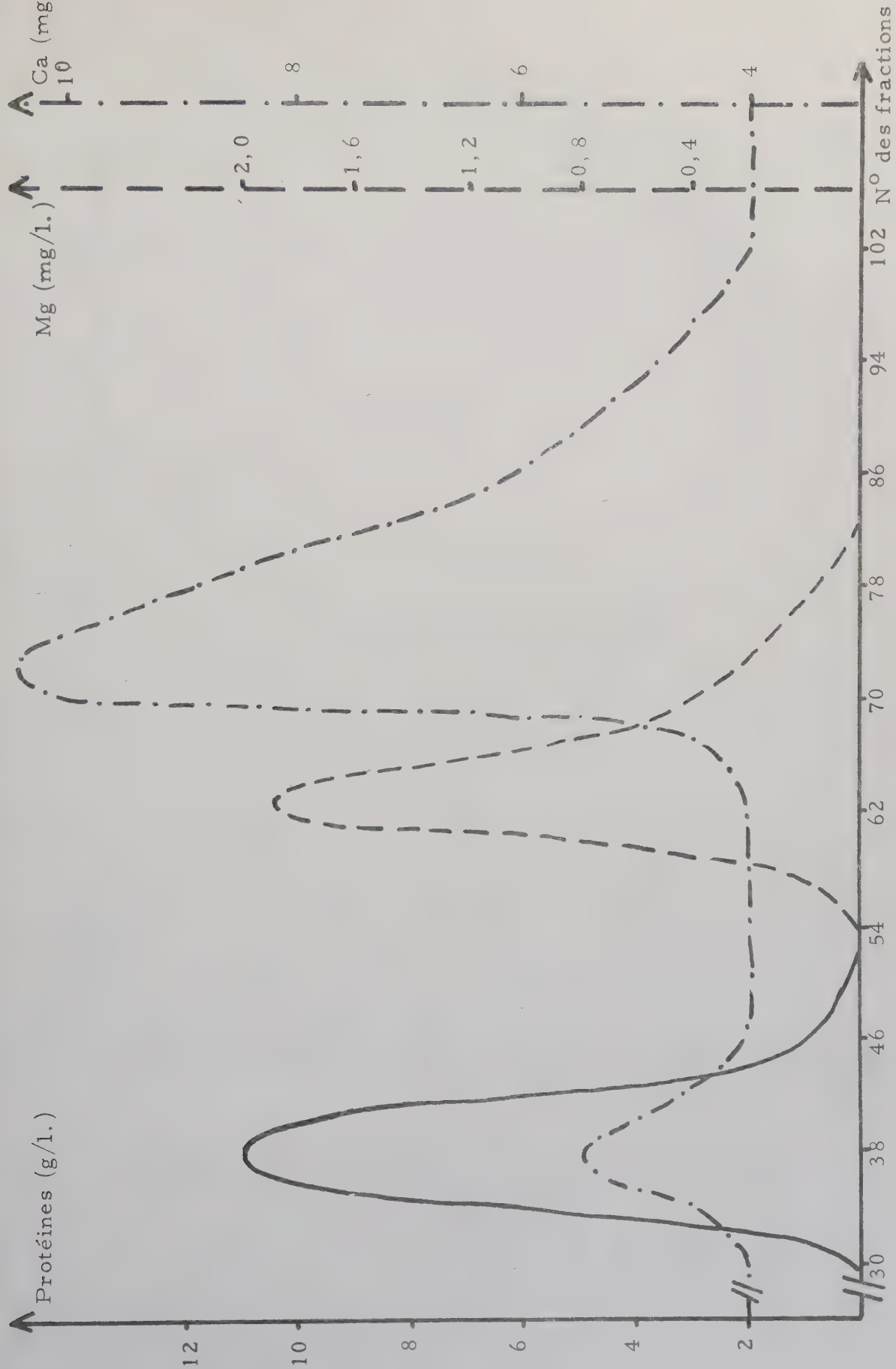


Figure 9

COURBES D'ELUTION DU SERUM (— PROTEINES, - - - Mg, - · - Ca)
 AVEC UN LIQUIDE RENFERMANT 4 mg/l. DE Ca

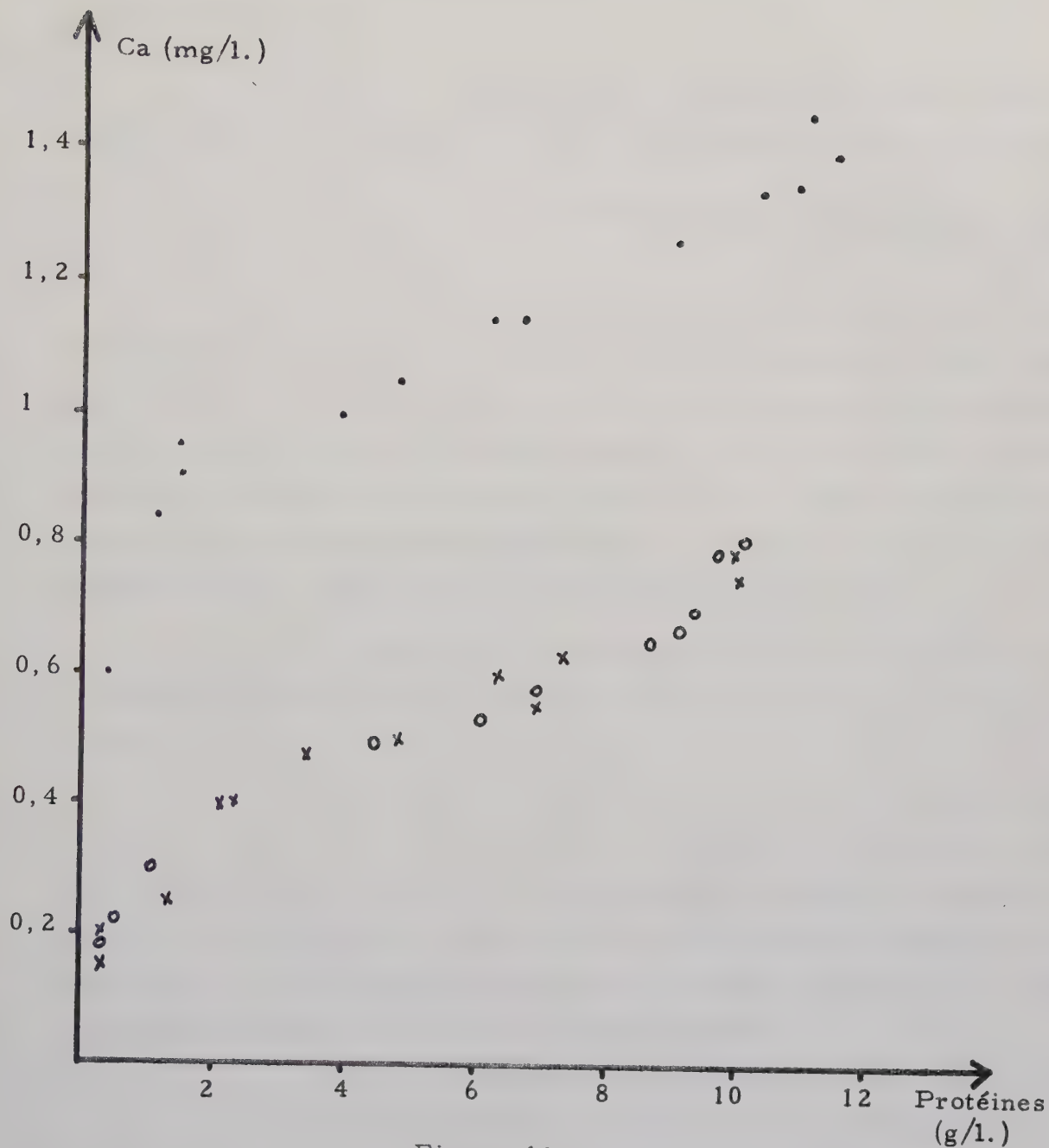


Figure 10

TAUX DE Ca EN FONCTION DE CELUI DES PROTEINES

ELUANT	4 mg/l. Ca	•
	4 mg/l. Ca 2,4 mg/l. Mg	+
	2 mg/l. Ca 2,4 mg/l. Mg	○

dre avec celle de la droite théorique du taux de Ca par rapport au taux de protéines (figure 10).

2 - 4 - 5 - Expériences conduites en présence d'une concentration fixe en magnésium ($5 \cdot 10^{-5}$ M) et de proportions variables de calcium :

2 - 4 - 5 - 1 - Concentrations équimolaires de Mg^{++} et de Ca^{++} :

Les courbes de la figure 11 correspondent aux tracés obtenus dans les mêmes conditions que celles de la figure 6, mise à part la présence dans le liquide d'élution tamponné des éléments dont on se propose d'étudier les liaisons avec les protéines. Le Ca^{++} et le Mg^{++} de l'éluant sont à des concentrations molaires égales à $5 \cdot 10^{-5}$ M soit respectivement 4 mg et 2,4 mg/l. Au niveau des protéines, les pics relatifs au Mg et au Ca réapparaissent comme dans les expériences des paragraphes 2-4-3 et 2-4-4.

Les courbes représentatives du taux des alcalino-terreux en fonction de celui des protéines permettent de faire les constatations suivantes :

- quant au magnésium (figure 8), la pente est identique à celle de l'expérience où l'éluant ne renferme que du magnésium. Néanmoins, un petit infléchissement pour des concentrations protéiques supérieures à 6 g/l apparaît, il résulte vraisemblablement du caractère réversible de la combinaison (Prot. - Mg). Deux hypothèses sont possibles pour expliquer l'incapacité du Mg à ce taux de saturer les sites protéiques :

- . soit une insuffisance de la teneur en Mg
- . soit une limitation du taux de fixation du Mg par suite de la présence du Ca au taux de 4 mg/l.

C'est plutôt la deuxième hypothèse qui semble satisfaisante puisque en l'absence de Ca dans le liquide d'élution, la courbe conserve sa pente.

- quant au calcium (figure 10), il conserve les deux parties de la courbe mises en évidence au paragraphe 2-4-4. Cependant, celle correspondant à la capacité maximum de saturation se limite à 1 g de protéines au

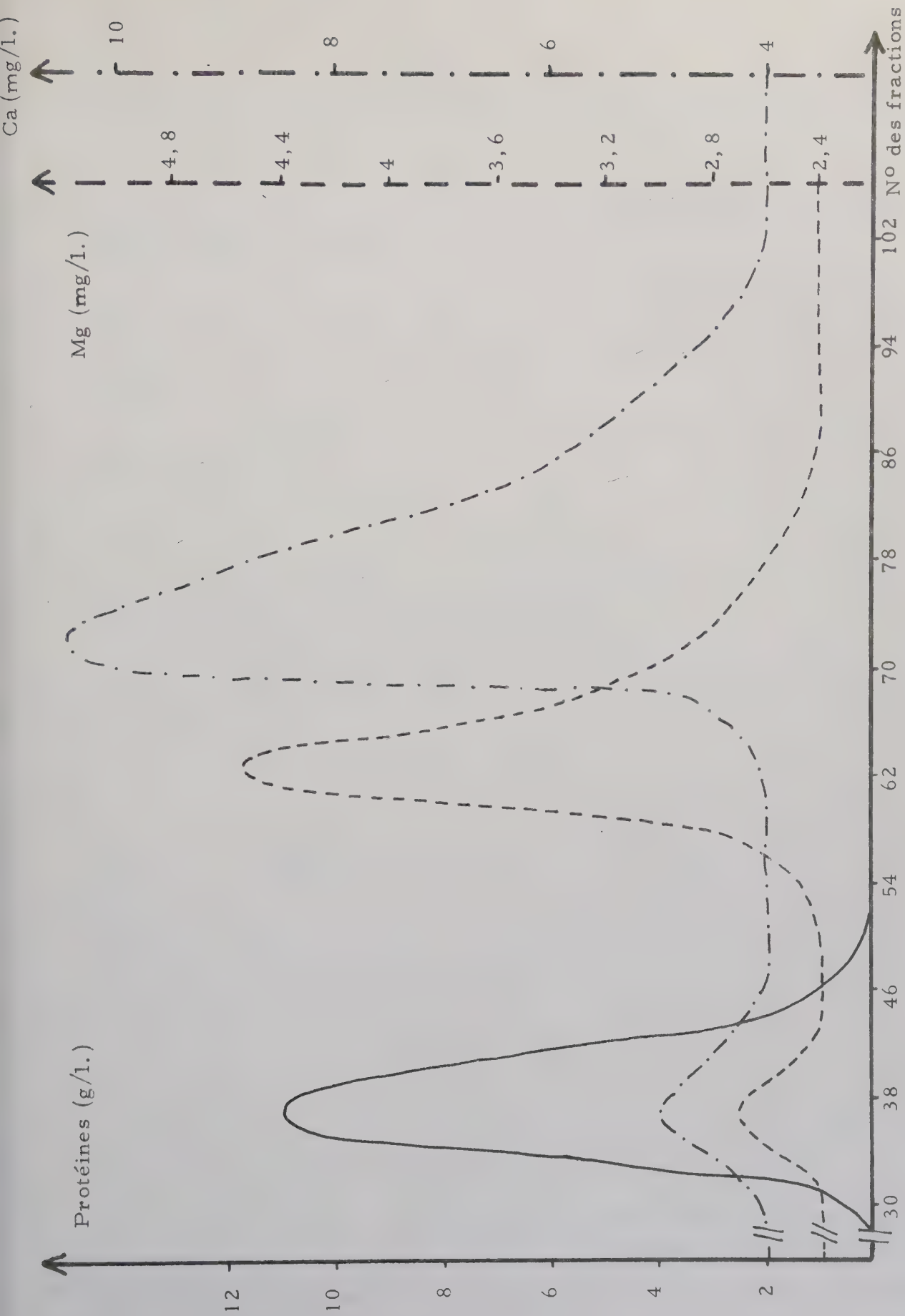


Figure 11

COURBES D'ELUTION DU SERUM (— PROTEINES, ---Mg, -.-.-Ca)
 AVEC UN LIQUIDE RENFERMANT 4 mg/l. DE Ca ET 2,4 mg/l. DE Mg

lieu de 2 g. Le pente de la deuxième partie est identique à celle de l'expérience 2 - 4 - 4.

2 - 4 - 5 - 2 - Concentrations non équimoléculaires de Mg^{++} et de Ca^{++} :

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé un éluant renfermant deux fois moins de calcium ($2,5 \cdot 10^{-5} M$ correspondant à 2 mg/l) et le même taux de magnésium ($5 \cdot 10^{-5} M$ ou 2,4 mg/l).

- Magnésium : Les points représentatifs par rapport aux taux de protéines des différentes fractions recueillies se confondent avec ceux de l'expérience précédente (figure 8), mais on ne remarque pas l'infléchissement au-delà de 6 g de protéines/l. Il semble donc qu'en présence d'un taux deux fois plus faible en calcium, 2,4 mg de magnésium se révèlent capables de saturer jusqu'à 10 g de protéines par litre.

- Calcium : La courbe est identique à celle de l'expérience précédente.

De ces expériences, ressortent les deux constatations suivantes :

1° Pour des rapports de concentration molaire $\frac{Mg}{Ca} \gg 1$ (soit en mg/l, $\frac{Mg}{Ca} \gg \frac{2,4}{4}$), le calcium modifie très peu les conditions de fixation du magnésium sur les protéines ; la compétition semble n'intervenir que pour limiter la saturation des protéines par le magnésium lorsque ces dernières dépassent 6 g/l, sans que le taux de saturation soit changé pour les fractions renfermant une moindre quantité de protéines.

2° La présence du magnésium semble avoir un effet directeur sur le taux de fixation du calcium, effet d'ailleurs qualitatif, puisque la variation du taux de calcium dans l'éluant n'influence pas l'allure générale de la courbe, tant que le magnésium est présent dans l'éluant.

2 - 4 - 5 - 3 - Durant toutes les expériences précédentes, on remarque que la concentration protéique de l'éluat est plus faible que celle du sérum introduit dans la colonne, en raison de la dilution

inévitables apportées par la chromatographie sur gel. En fonction des conclusions tirées des expériences d'ultrafiltration, il est vraisemblable que cette dilution soit en partie responsable de la dissociation du complexe protéines-métal au profit de : protéines + métal durant la première expérience, ou d'un faible taux de fixation sur les protéines durant les autres expériences.

C'est pourquoi, nous avons mis en oeuvre un volume plus important de sérum afin de modifier les concentrations en protéines de l'éluat et, par suite, de déterminer ainsi l'influence de la concentration sur le taux de fixation du métal.

Un temps d'application de l'échantillon sérique plus prolongé (5 minutes correspondant à 6,25 ml de sérum) permet d'obtenir des fractions renfermant des taux de protéines plus élevés (jusqu'à 23 g/l). Avec l'éluant renfermant 4 mg de Ca, 2,4 mg de Mg/l, il n'y a pas de modification du taux de saturation des protéines par rapport à l'expérience précédente (prolongation de la courbe pour Mg, de la deuxième partie de la courbe pour Ca) (figures 12 et 13).

Ces résultats tendent à démontrer que l'effet de la dilution est, dans cette expérience et pour la zone de concentration étudiée, moins important que celui de l'exclusion moléculaire. Celle-ci provoque la rupture des liaisons protéiques des alcalino-terreux dans un milieu dépourvu d'éléments minéraux libres, puisque l'augmentation de la concentration des protéines (jusqu'à 23 g/l) n'améliore pas le taux de fixation du magnésium et du calcium.

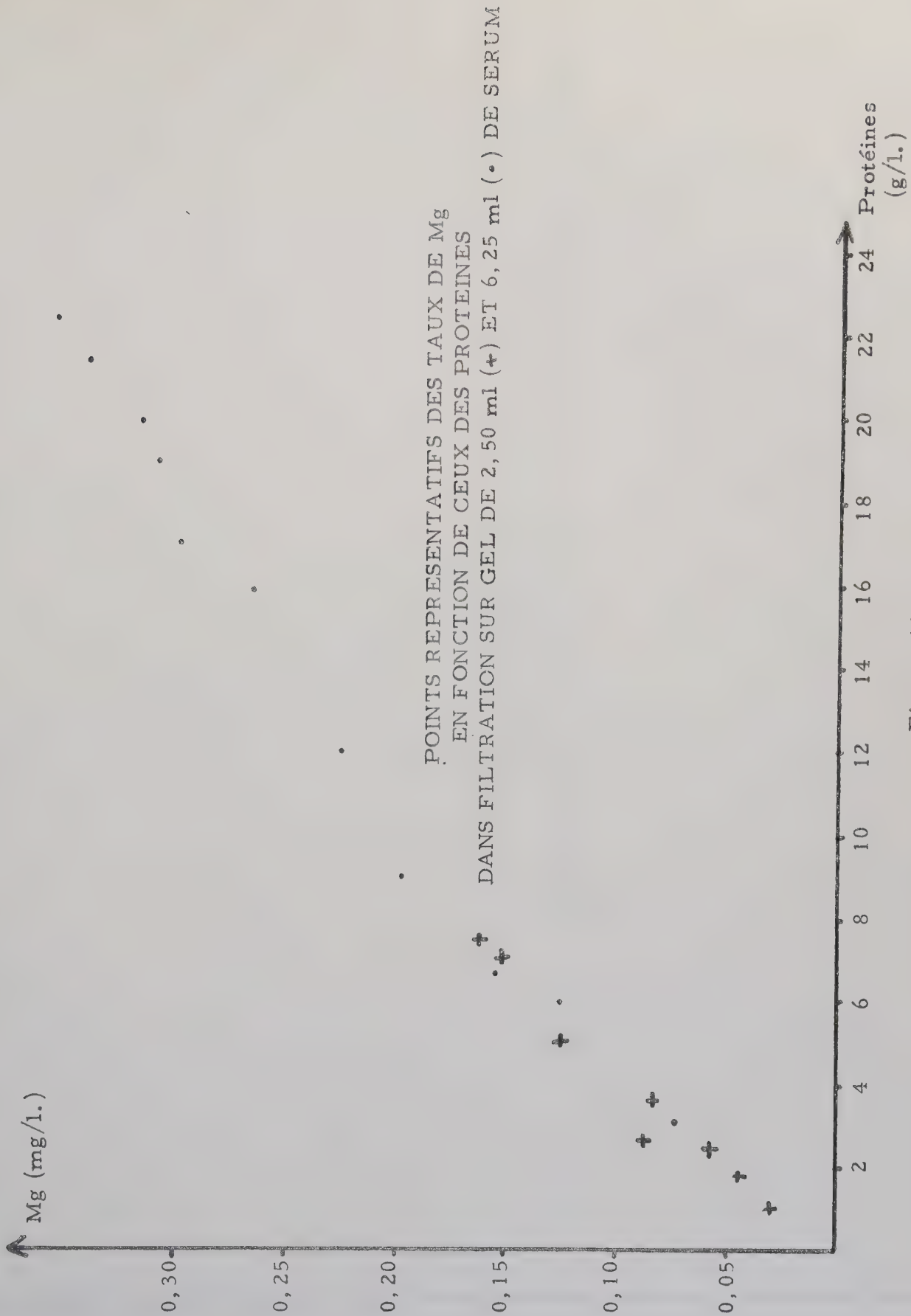
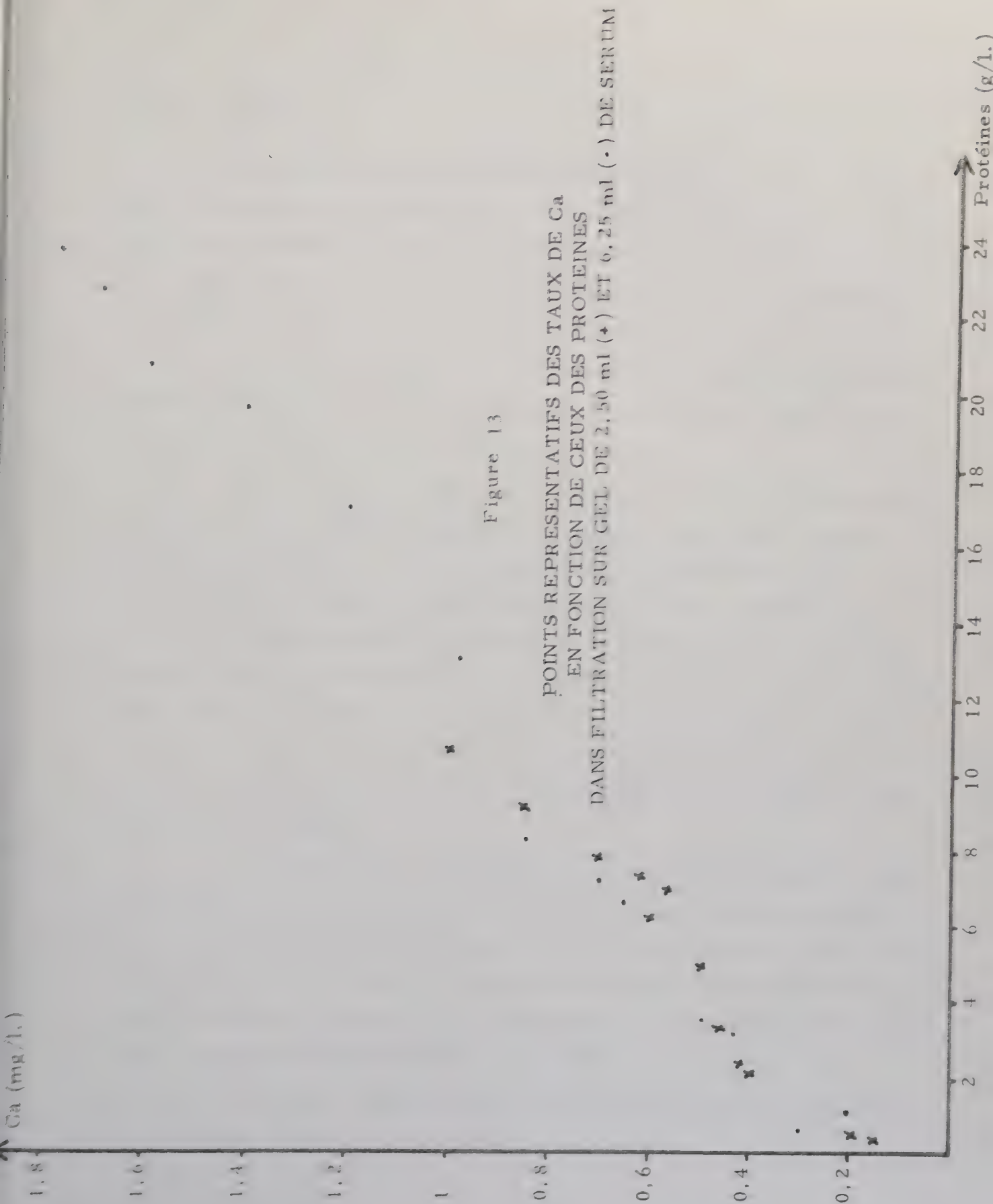


Figure 12



CONCLUSION :

Les expériences précédentes permettent de confirmer des notions précédemment apportées par les résultats de l'ultrafiltration, à savoir que la labilité des liaisons contractées entre les protéines et le calcium ou le magnésium se trouve parfaitement démontrée et que le caractère réversible de celles-ci est bien mis en évidence.

Il est ainsi confirmé que la mesure des "fractions protéiques", telles qu'elles existent réellement dans le sang circulant, exige l'absence de tout traitement physique ou chimique du sérum.

En outre, le procédé de gel filtration fournit des nouvelles indications : des résultats des expériences utilisant, -un liquide d'élution renfermant du Mg^{++} (2 - 4 - 3) -un liquide d'élution renfermant du Ca^{++} (2-4-4) -et un liquide renfermant du Mg^{++} et du Ca^{++} (2-4-5), il ressort que le nombre de sites protéiques capables de fixer le magnésium et le calcium apparaît beaucoup plus faible dans ces conditions de gel filtration qu'en milieu physiologique (sauf pour de très faibles concentrations en protéines dans le cas du calcium). Cette modification de propriété peut vraisemblablement être attribuée à un remaniement de la structure tertiaire ou quaternaire des protéines.

L'expérience 2 - 4 - 5 reflète l'influence de la présence du magnésium sur le taux de fixation du calcium. En effet, la présence du magnésium diminue nettement le taux de liaison du calcium avec les protéines. Il semble alors vraisemblable que certains sites de fixation se trouvent communs aux deux cations, vis-à-vis desquels le magnésium présente toujours une affinité plus grande que le calcium.

Par contre, la présence de calcium dans le milieu ne paraît pas influencer les liaisons protéines-Mg.

Cette différence de comportement de deux cations étudiés peut, sans doute, éclairer d'un jour nouveau les observations effectuées lors des syndromes de carence ou de surcharge.

3 - ANALYSE PAR ECHANGE D'IONS

SCHIRARDIN et METAIS (148) ont décrit en 1959, une technique utilisant une résine échangeuse d'ions, la Permutite, pour évaluer les différentes fractions plasmatiques du calcium. Ces auteurs avaient remarqué que l'addition de citrate au sérum sanguin modifiait considérablement la cinétique de la fixation du calcium par la résine.

Par ailleurs, MAC LEOD (97) puis FRIZEL et Coll. (45), ont suggéré l'utilisation de la faible capacité d'échange de cations de certaines substances pour l'estimation du Ca et du Mg sériques ionisés. Une bande de cellophane, imprégnée de Rouge Congo ou servant de matrice au groupement actif aryl sulfonique (45), est placée dans le sérum ; elle fixe les cations présents proportionnellement à leur concentration dans l'échantillon. Après élution, les ions fixés sont déterminés par une méthode conventionnelle (97)(60)

Nous avons pensé que les possibilités nouvelles de précision apportées par la spectrométrie d'absorption atomique permettraient de mieux utiliser les moyens offerts par l'emploi des échangeurs d'ions pour la détermination de la fraction "complexée" du magnésium, et de préciser la nature de celle-ci.

3 - 1 - Rappel des équations fondamentales de l'équilibre dans les phénomènes d'échanges d'ions

Le but de cette étude théorique n'est pas de permettre la déduction par calcul des concentrations des ions échangeables entre les différentes phases, mais de mettre en évidence ceux des facteurs dont l'influence apparaît non négligeable au cours de l'expérimentation biologique.

Il y a échange d'ions lorsqu'on met en contact une solution d'électrolytes avec une phase solide insoluble renfermant des ions mobiles fixés aux groupements positifs ou négatifs d'un support.

Si un échangeur de cations est en phase H^+ , l'échange avec une

solution contenant un ion métallique divalent M^{2+} sera exprimé par l'équation : $M^{2+} + 2(H^+ R^-) = M^{2+} (R^-)_2 + 2H^+$ (1).

R^- représente le site négatif du support échangeur, généralement une résine synthétique composée d'un réseau de polymères ramifiés possédant des groupements terminaux anioniques SO_3^- , COO^- ou OH phénolique.

La capacité d'un échangeur d'ion, symbolisée par C , indique le nombre de milliéquivalents par unité de poids de résine sèche. Elle est évidemment fonction du degré d'ionisation des groupements actifs présents à la surface de l'échangeur, et varie avec le pH. Pour les échangeurs organiques, elle est de l'ordre de 3 - 6 meq/gramme de résine.

Tous les sites d'une résine échangeuse doivent être occupés par des ions, mais on peut charger celle-ci plus ou moins complètement avec un ion particulier.

La charge L d'une résine échangeuse de cations par un ion métallique M est définie par la relation : (136)

$$L = n (M)_r / C \quad (2)$$

où n est la valence de l'ion et $(M)_r$ la concentration de M dans la phase solide. Dans le cas d'un métal divalent, l'application de la loi d'action de masse à l'équation (1) conduit à la relation d'équilibre :

$$K_{2H}^M = (M)_r (H)^2 / (M)(H)_r^2 \quad (3)$$

L'exposant et l'indice de K indiquent la nature et le nombre des 2 cations échangés. L'indice r , affectant les concentrations, est relatif à la phase solide ; les lettres sans indice, se rapportant à la phase liquide.

La répartition d'un ion métallique M^{n+} entre une phase solide et une phase aqueuse s'exprime par un coefficient de partage D^M défini par l'équation : $D^M = (M)_r / (M)$ (4)

Si la résine est chargée initialement avec des ions sodium, le coefficient de partage est relié à la constante d'équilibre définie par l'équation (3) de la façon suivante :

$$D^M = (M)_r / (M) = ((Na)_r / (Na))^n K_n^M Na \quad (5)$$

Lorsque M est à l'état de traces, $(Na)_r$ sera sensiblement constant, c'est-à-dire $D^M = \text{constante } (Na)^{-n}$ (6)

L'échange est d'autant plus important que M a une valence plus élevée. L'équation (6) indique que si D^M est connu pour une certaine valeur de (Na) (ou pour la concentration d'un autre ion fixé par la résine), il est possible de calculer D^M pour toute autre valeur de (Na) . De plus, la variation de $\text{Log } D^M$ en fonction de $\text{Log } (Na)$ est linéaire. Dans notre travail, nous avons tenu compte expérimentalement des effets de cette variation en opérant comparativement avec des solutions artificielles contenant les électrolytes plasmatiques.

Le coefficient de partage varie considérablement suivant la nature de l'échangeur et aussi suivant la nature des ions. Comme l'indique l'équation (5), il dépend beaucoup de la valence de ces derniers, les ions trivalents étant plus facilement captés que les ions bivalents, eux-mêmes encore plus que les ions monovalents ; ceci implique que les résines sont habituellement chargées avec des ions monovalents pour les applications analytiques nécessitant un échange plus ou moins complet. Pour les ions de même valence, l'échange s'effectue au profit des ions de poids atomique plus élevé .

Le coefficient de partage ne suffit pas, à lui seul, à donner des renseignements sur la proportion de métal fixé ou non par une résine. Il faut prendre également en considération la quantité de résine et le volume de la solution.

En plus de la charge, de la dimension des ions, la "force" du groupement acide des résines échangeuses de cation affecte la sélectivité des échanges. L'Amberlite IR 120, résine ayant comme matrice le polystyrène et des groupements fonctionnels $SO_3 H^-$, se comporte comme un puissant

échangeur de cation, actif à tous les pH.

3 - 2 - Technique d'échange d'ions sur résine

3 - 2 - 1 - Préparation de la résine

On met en contact de l'Amberlite IR 120 avec de l'acide chlorhydrique à 10 % (50 g dans 500 ml de solution acide environ). Puis, on traite la résine, alors en phase acide, avec une solution concentrée de chlorure de sodium par décantations successives jusqu'à ce que le surnageant conserve le pH de la solution utilisée. On continue les lavages avec de l'eau bidistillée pour éliminer toute trace de Na Cl resté soluble. La résine en phase (Na) est ensuite conservée sous solution de Na Cl à 9°/°.

3 - 2 - 2 - Mode opératoire

La technique classique d'échange d'ions sur résine s'effectue habituellement en flux continu dans une colonne. Ce mode opératoire ne convient pas aux études cinétiques qui nous paraissaient nécessaires. C'est pourquoi, au cours de notre travail, nous avons utilisé la méthode discontinue qui consiste à ajouter la résine dans le liquide contenant les différentes formes de calcium et de magnésium à séparer, puis, après des temps variables de contact sous agitation continue, à doser ces éléments dans le liquide surnageant.

Toutes nos expériences sur le sérum humain ont été réalisées comparativement avec une solution artificielle contenant les électrolytes sériques à la concentration suivante :

Na ⁺	3,20 g	→	8,1 g Na Cl en tenant compte
	de Na de PO H Na ₂		
K ⁺	0,18 g	→	0,34 g K Cl
Ca ⁺⁺	0,10 g	→	0,25 g de Ca CO ₃
Mg ⁺⁺	0,02 g	→	0,069 g Mg CO ₃
PO ₄ ⁻⁻⁻	0,03 g	→	0,044 HNa ₂ PO ₄
Eau bidistillée q. s. p. . .	1 000 ml		

Notre étude a pour but de déterminer les fractions calcique et magnésique des milieux naturels et artificiels non échangeables avec les cations de la résine dans des conditions bien déterminées. Pour ce faire, on établit une courbe cinétique de fixation du Ca et du Mg sur la résine échangeuse d'ions. Le sérum ou la solution d'électrolytes, traités par l'Amberlite sodique, échangent leurs ions Ca^{++} et Mg^{++} contre le Na^+ de la résine.

Dans un verre cylindrique de 25 ml, placé sur agitateur magnétique, on introduit 5 ml de sérum. On provoque une agitation régulière, puis on ajoute 1 g de résine Amberlite IR 120 (en phase sodique) en déclenchant un chronomètre.

Les prélèvements destinés aux dosages sont pratiqués aux temps 0 (avant l'addition de la résine), 1 - 3 - 5 - 7 - 9 minutes (après addition de résine). On procède à une dilution au 1/50^e pour le premier prélèvement et au 1/25^e pour les autres, avec la solution de lanthane à 5°/‰. Les mesures sont effectuées comparativement avec des solutions étalons de concentrations : 0,50 - 1,00 - 1,50 - 2,00 - 2,50 µg/ml pour Ca et 0,25 - 0,50 - 0,75 µg/ml pour Mg.

3 - 2 - 3 - Résultats :

Les résultats obtenus avec le sérum normal et la solution d'électrolytes sont résumés dans le tableau VII .

On constate, pour chacune des fractions calcique et magnésique, que cet échange évolue selon un rythme particulier pour la solution d'électrolytes et pour le sérum :

TABLEAU VII
EVOLUTION AU COURS DU TEMPS DE LA TENEUR EN Mg ET EN Ca
DU LIQUIDE SURNAGEANT LA RESINE

Temps de prélèvement	Sérum		solution d'électrolytes	
	Mg (mg/l)	Ca (mg/l)	Mg (mg/l)	Ca (mg/l)
0	21,00	100,0	20,0	100,0
1 min.	6,15	32,0	2,10	3,6
3 min.	2,57	11,5	0,54	1,7
5 min.	2,20	8,75	0,50	1,5
7 min.	2,10	8,50	0,50	1,5
9 min.	2,10	8,50	0,50	1,5

- solution d'électrolytes

Elle conduit à un équilibre avec 0,50 mg/l de Mg et 1,08 mg/l de Ca prévus par l'équation (6) de la constante d'équilibre $D_M = \frac{(M)_r}{(M)} = \frac{(Na)_r}{(Na)} K_n^M$. Les courbes représentatives ont deux pentes, la première rapide (1 minute), la deuxième plus lente, traduisant l'approche de l'équilibre du milieu (figure 14 pour Mg, figure 15 pour Ca), (courbes en traits interrompus).

- sérum

Les courbes de fixation du calcium et du magnésium sur la résine sont d'allure exponentielle, permettant de repérer trois phases successives :

- . la première très rapide ;
- . la seconde de pente moins importante ;
- . et enfin, la troisième suffisamment lente pour pouvoir être considérée comme représentant l'équilibre entre les éléments fixés et les éléments restant dans le surnageant, ces derniers demeurant dans le sérum à un taux supérieur à celui de la solution d'électrolytes (figure 14 et 15 en traits pleins).

Au cours de l'échange d'ions, les taux de Mg et de Ca restant

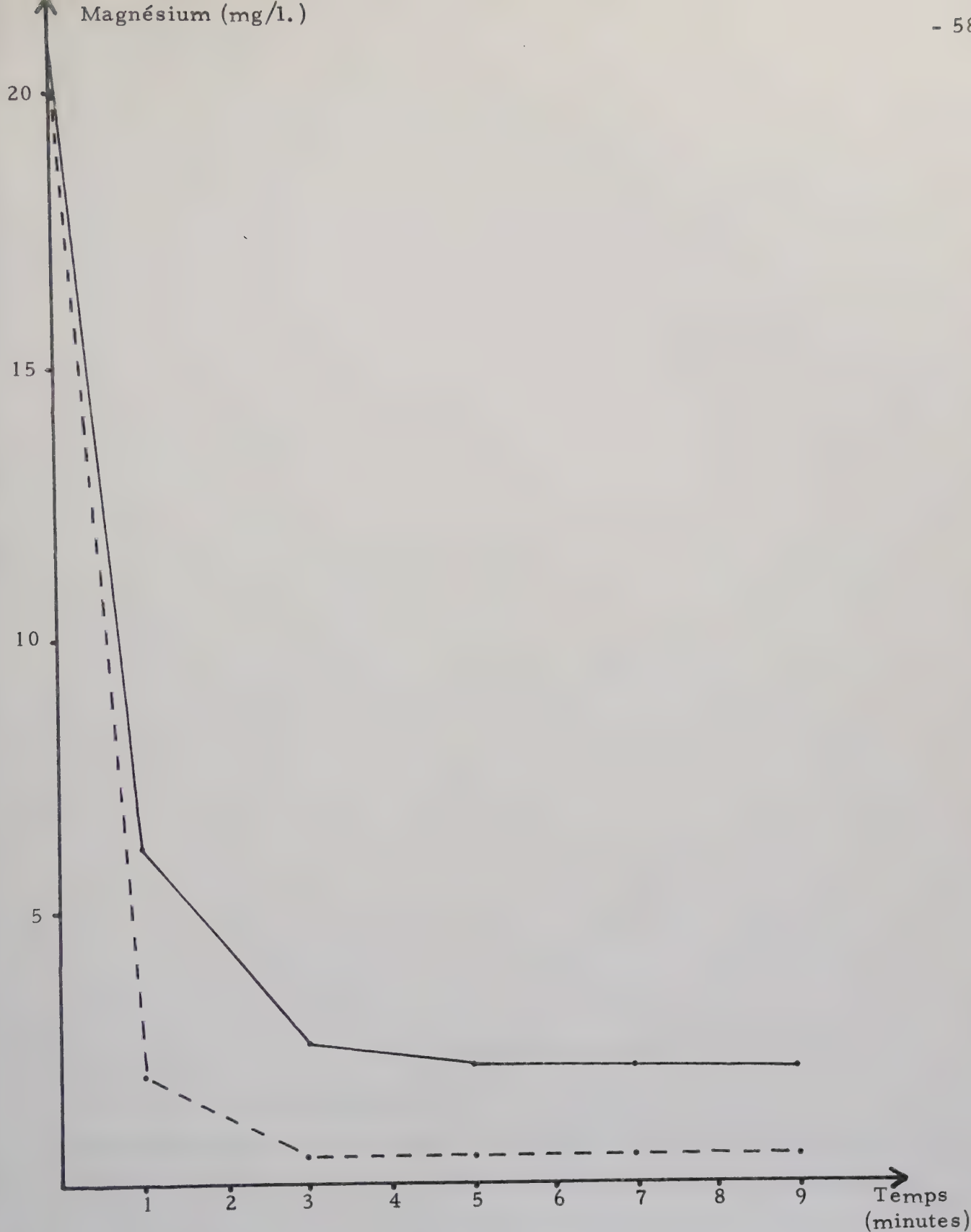


Figure 14

TAUX DU MAGNESIUM AU COURS DE L'ECHANGE D'IONS

— Sérum

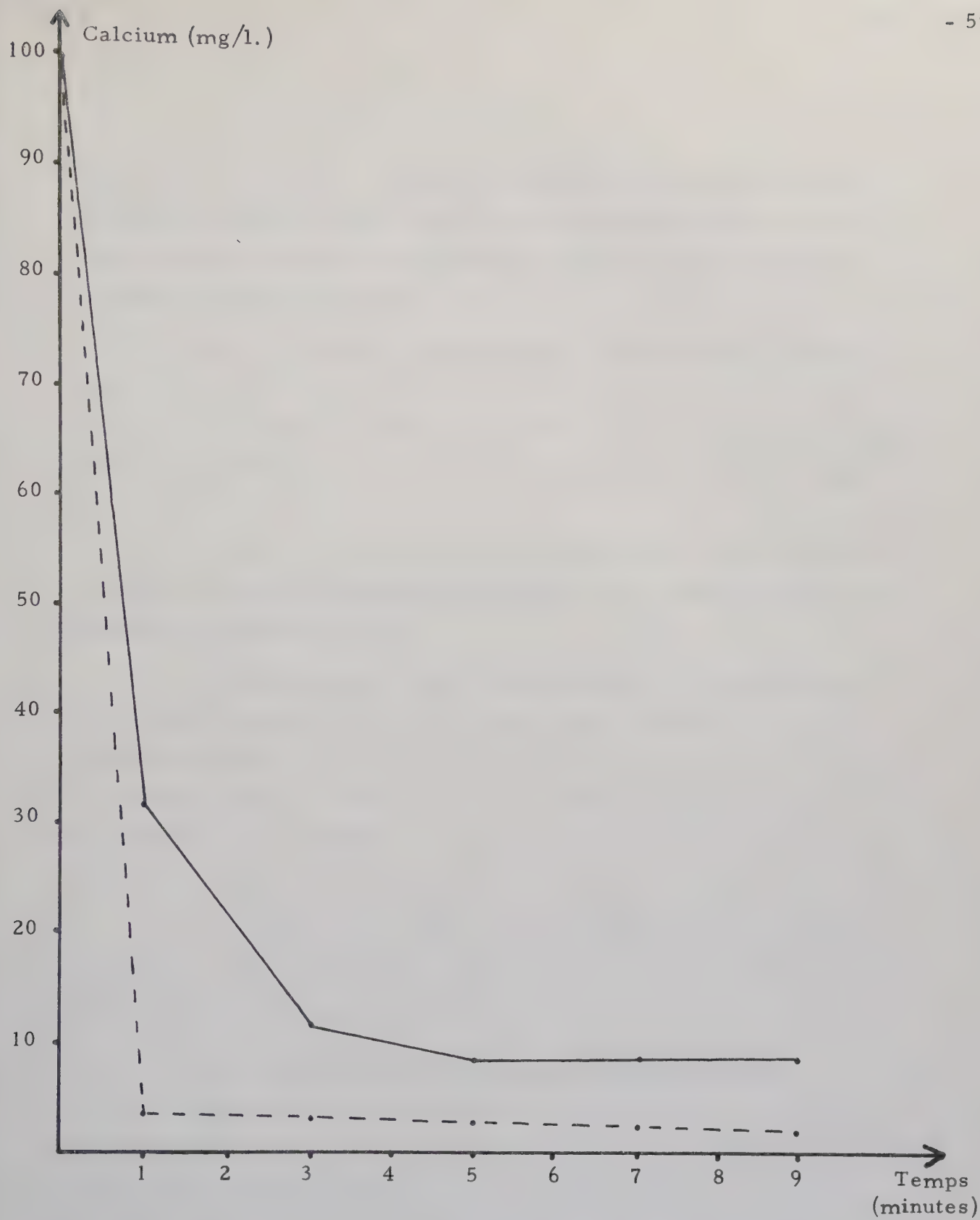


Figure 15

TAUX DU CALCIUM AU COURS DE L'ECHANGE D'IONS

— Sérum
--- Solution d'électrolytes

dissimulés vis-à-vis de la résine, correspondent approximativement aux taux généralement admis pour les formes complexées ultrafiltrables. Il semble donc, que, dans ces conditions, Mg et Ca liés aux protéines se conduisent comme des ions.

Pour interpréter ce phénomène, on peut évoquer deux hypothèses :

1° soit que le complexe protéine-métal conserve une charge électrique permettant la fixation sur les groupements anioniques de la résine ;

2° soit une labilité des liaisons protéiques telle que leur rupture dans ces conditions permette l'échange avec la résine du cation préalablement lié aux protéines.

Quoiqu'il en soit, on ne peut incriminer ici l'influence de variation de pH, puisque, au cours de l'expérience précédente, celui-ci augmente très peu, de 0,20 à 0,30 unité à 37° C (l'activité ionique de l'ion sodium cédé par la résine au milieu liquide est, en effet, plus grande que celle des ions magnésium et calcium captés). Dans le cas du sérum, le grand pouvoir tampon des protéines limite encore les variations de pH;

Il convenait donc d'étudier dans quelle mesure certains ions complexants, comme le citrate, pouvaient être réellement responsables du phénomène décrit précédemment.

3 - 3 - Equilibre en présence d'agents complexants

On admet généralement que le magnésium et le calcium non ionisés ultrafiltrables se trouvent essentiellement sous forme de phosphates et plus encore de citrates ; il apparaissait donc indispensable de prouver que le citrate, dans les conditions physiologiques, pouvait effectivement dissimuler les ions Mg^{++} et Ca^{++} vis-à-vis de l'Amberlite en phase sodique, en formant des complexes de constante de stabilité suffisante.

3 - 3 - 1 - Réaction de formation de complexes. Terminologie et considérations générales.

Il n'existe réellement d'ions "nus" qu'en phase gazeuse à haute température. Dans les solutions de sels métalliques, les ions sont toujours solvatés, les molécules de solvant pouvant être toutefois plus ou moins liées à l'ion central (137). La gaine de solvant constitue une partie très importante de l'ion métallique en solution, conditionnant sa réactivité.

La formation de complexe correspond donc au remplacement d'une ou de plusieurs molécules de solvant par d'autres groupes d'atomes et la complexation d'un ion métallique en solution aqueuse s'exprime par l'équation suivante :



L pouvant être une molécule ou un ion chargé. D'autres groupes L peuvent remplacer progressivement les groupes aquo restants jusqu'à la formation du complexe ML_n . On appelle coordinats, tous les groupes liés à l'ion central.

Il faut noter qu'un ion métallique peut présenter plusieurs nombres de coordination caractéristiques, selon la nature du coordinat. De plus, les divers métaux ont des aptitudes différentes à réagir avec un même coordinat.

Les forces de liaison sont, le plus souvent, de nature électrostatique et il est évident que les dimensions et les charges des constituants sont des facteurs importants. De plus, si le coordinat est une molécule, son moment dipolaire aura une influence primordiale sur le pouvoir complexant.

- ion métallique : d'après la classification de SCHWARZENBACH (151), le Ca et le Mg entrent dans la catégorie des cations à configuration de gaz nobles. Les phénomènes purement électrostatiques prédominent alors et conduisent à des complexes stables pour certaines conditions de pH.

- agent complexant : les molécules organiques renfermant deux ou plusieurs centres coordinateurs (donneurs d'électrons), sont susceptibles de se substituer à deux ou plusieurs molécules d'eau. Ils sont qualifiés de multidentés. Un coordinat multidenté peut se fixer au métal par deux ou plusieurs "dents" en donnant naissance à une structure cyclique ou "chélate" caractérisée par une stabilité remarquablement élevée en comparaison de celle des complexes formés par des coordinats unidentés. On peut comparer un agent chélatant multidenté à une pieuvre qui saisisrait sa proie avec ses tentacules ; les facteurs géométriques s'ajoutent aux facteurs électroniques.

Il ne faut pas perdre de vue la possibilité d'occupation des différents sites disponibles d'un élément par des agents complexants ou des molécules différentes et un agent complexant peut ne pas occuper tous les sites disponibles, si bien qu'un complexe peut être chargé électriquement et susceptible d'échange contre d'autres ions (si on assimile les pôles receveurs d'électrons à des sites).

Les propriétés d'un complexe dépendent de l'atome donneur des électrons (168) : oxygène ou azote.

- si l'oxygène est l'atome donneur, la liaison entre l'agent complexant et l'élément est de nature ionique. C'est le cas dans EDTA et citrate. Alors, la stabilité dépend des facteurs entropiques.

- dans le cas de l'azote, la liaison est de nature covalente. Ex. EDTA. Là, les facteurs enthalpiques l'emportent.

Les meilleurs agents chélatants sont ceux qui renferment l'oxygène et l'azote, comme l'acide éthylène diamino tétracétique (EDTA).

3 - 3 - 2 - Echange d'ions en présence d'agent complexant

L'influence des réactions de formation de complexes sur un équilibre donné, peut s'appliquer aux processus d'échange d'ions. Cependant, il faut rappeler que les propriétés d'échange d'ions d'un composé complexe dépendent avant tout de sa charge.

Si le coordinat ajouté est une molécule neutre, la charge de l'ion ne sera pas modifiée par formation de complexe ex-ammonium (NH_3), eau (H_2O). L'ordre de grandeur de la constante d'échange sera rarement modifié (66).

Il se produit des variations plus importantes des propriétés d'échange si la réaction de formation de complexes modifie la charge de l'ion. Les molécules non chargées, s'il s'en forme, ne se fixent pas sur la résine car les effets d'adsorption sont en général très faibles.

La modification la plus importante des propriétés d'échange se produit lorsque la charge ionique change de signe : si un cation métallique est transformé quantitativement par un anion complexant en ion complexe de charge négative, un échangeur de cations ne retiendra que des quantités faibles de métal. Des complications en résultent lors de la fixation de complexes métalliques négatifs sur les échangeurs d'anion. Ces anions peuvent disputer les sites de la résine aux autres anions présents.

En utilisant un échangeur de cation pour séparer les formes de Ca et de Mg échangeables, un excès d'anion multivalent modifiera seulement indirectement l'équilibre d'échanges de cations.

Les ions métalliques alcalins fixés sur la résine ne forment pas de complexes avec la plupart des agents complexants et n'interfèrent donc pas de façon notable au cours de l'analyse.

L'allure des courbes de mobilisation du Ca et du Mg sé-

riques par l'échangeur de cation de l'expérience précédente reflète l'intensité des forces de liaisons de ces éléments. La cinétique première est approximativement aussi grande dans le cas du sérum que de la solution artificielle. Ce qui permet de confirmer qu'il existe dans le sérum une partie importante de calcium et de magnésium libre ou combinée, mais ayant une charge positive donnant lieu à des échanges avec le sodium ; l'asymptote de la courbe finale objective les formes non échangeables du Ca et du Mg. Celle de la solution artificielle revient à un équilibre entre éléments fixés sur la résine et éléments libres. La différence entre sérum et solution artificielle indique la présence d'un Ca et d'un Mg non mobilisables dans les conditions de l'expérience, donc vraisemblablement complexé naturellement à l'état physiologique.

L'addition d'un agent complexant modifie complètement les conditions d'équilibre du milieu. Mise à part l'action sur la force ionique, le pH, le complexant influe sur l'équilibre d'échange, différemment selon sa nature.

Nous avons étudié successivement trois agents complexants dont les constantes de stabilité avec le Ca et le Mg sont très différentes : l'EDTA, l'ion citrate et l'ion tartrate.

3 - 3 - 2 - 1 - E D T A

On ajoute à 4,5 ml de sérum ou à 4,5 ml de solution d'électrolytes, 0,5 ml de solutions d'EDTA de concentration convenable pour que la teneur finale varie entre 0,25 g et 5 g/l de sérum. L'addition de résine et les prélèvements en fonction du temps sont menés comme pour l'expérience précédente. Les résultats des dosages sont résumés dans les figures 16 et 17. On constate :

- dans le cas du calcium : (figure 16)

a) l'addition d'EDTA à différentes concentrations, rend

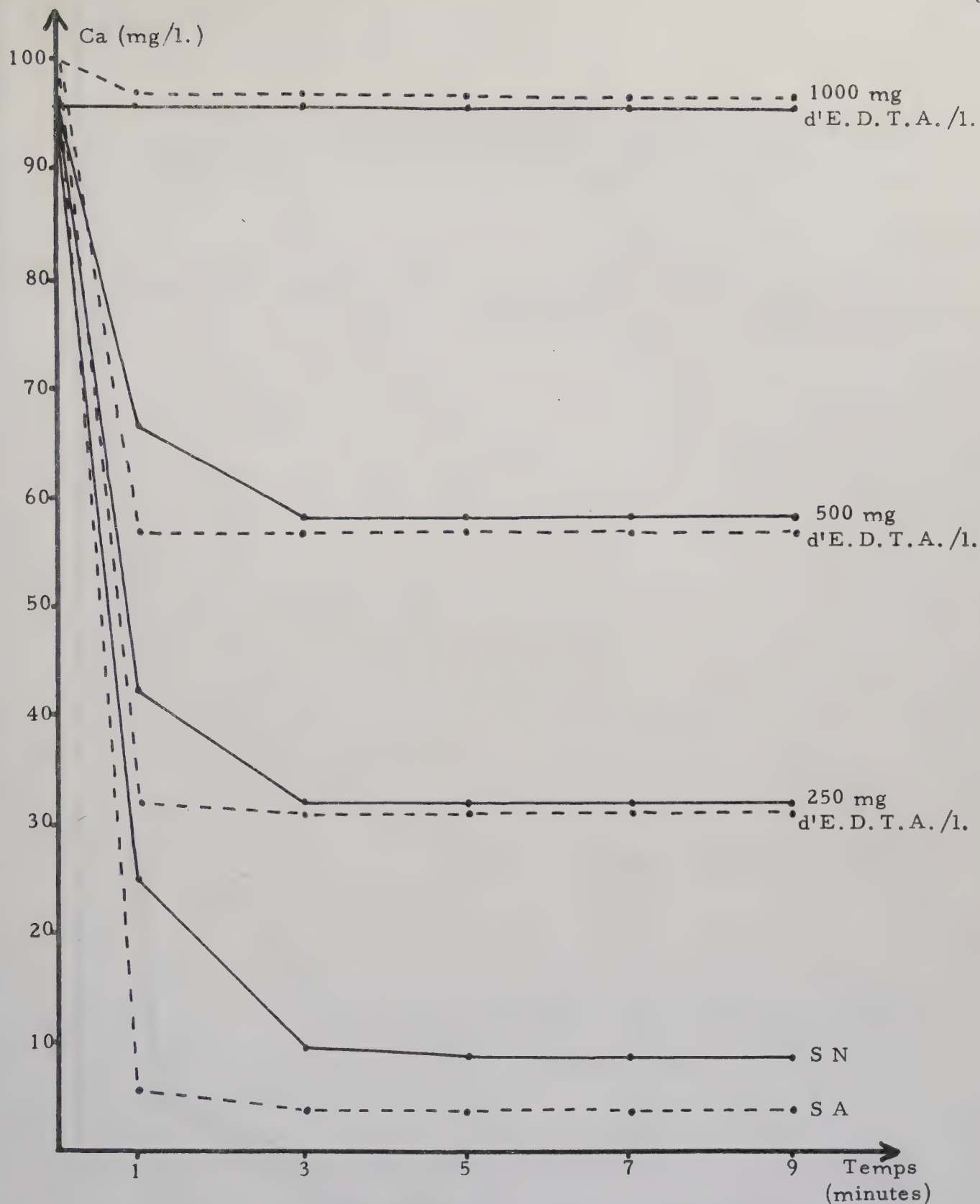


Figure 16

EVOLUTION DU TAUX DE CALCIUM DU SERUM SANGUIN (—)
 ET DE SOLUTION D'ELECTROLYTES (- -) EN PRESENCE D'E.D.T.A.
 AU COURS DE L'ECHANGE D'IONS

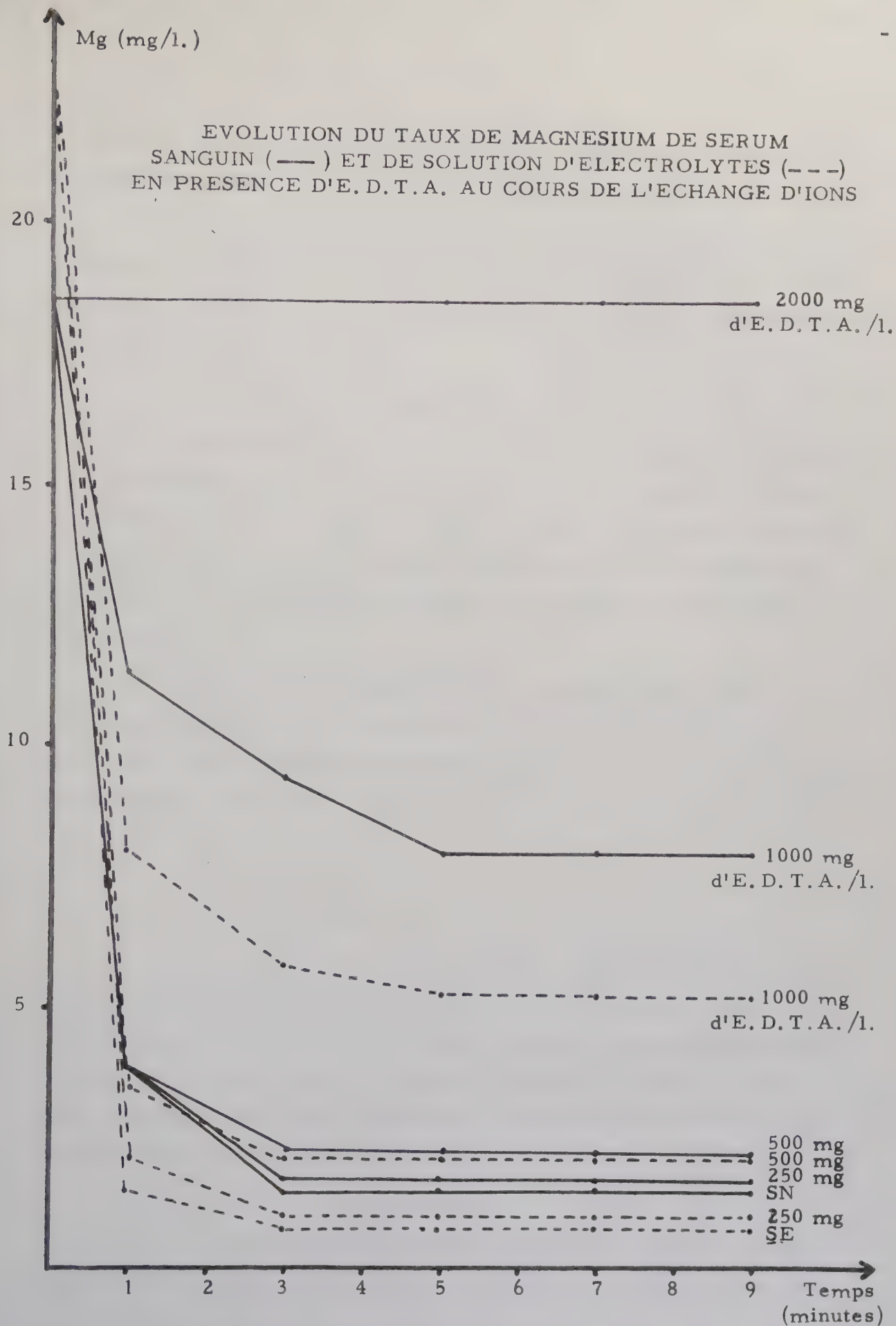


Figure 17

les courbes obtenues, respectivement avec le sérum et avec la solution d'électrolytes, très comparables entre elles.

b) le taux de Ca complexé, restant par conséquent dans le liquide surnageant, croît régulièrement avec l'augmentation de la concentration en EDTA ; 1 g de ce réactif suffit à dissimuler complètement le Ca vis-à-vis de la résine.

- dans le cas du magnésium :

Les résultats apparaissent sensiblement différents. En effet, les courbes obtenues respectivement avec le sérum naturel et la solution d'électrolytes s'écartent nettement, en particulier pour la concentration d'EDTA de 1 g/l; pour cette concentration d'EDTA, le taux de Mg dissimulé vis-à-vis de la résine apparaît nettement plus fort pour le sérum naturel.

Enfin, la concentration d'EDTA minimale pour obtenir une complexation totale, est ici double de celle qui est nécessaire pour le Ca, soit 2 g/l. Ce résultat concorde d'ailleurs bien avec les constantes de complexation annoncées par RINGBOM (138) qui sont respectivement, à pH 7, de :

. 7,3 pour le Ca

. 5,3 pour le Mg

On peut rapprocher ces résultats, obtenus in vitro, de l'hypothèse de MOSINGER qui attribue l'action lipolytique de l'EDTA sur le tissu adipeux à la chélation des cations divalents, physiologiquement importants, intervenant dans la régulation du système lipolytique. Cet effet, peut être inhibé par l'addition de Ca et de Mg dans l'incubat, ce dernier cation semblant plus actif (116).

3 - 3 - 2 - 2 - Ion citrate :

Une première expérience réalisée en ajoutant une dose importante de citrate (5 g/l à pH 4,2) conduit à des résultats très diffé-

rents de ceux fournis par l'EDTA. L'examen de la figure 18 pour le magnésium et de la figure 19 pour le calcium, montre qu'avec ce réactif l'action sur la solution d'électrolytes est pratiquement négligeable alors qu'elle est très importante dans le cas du sérum sanguin.

Cette discordance justifie l'étude particulière que nous avons faite de ce phénomène (c. f. 3 - 4).

3 - 3 - 2 - 3 - L'ion tartrate :

Il fournit des complexes à constante de stabilité beaucoup plus faible. Un essai préliminaire avec le sérum et la solution d'électrolytes a montré que, pour la concentration utilisée (5 g/l), le tartrate sodico-potassique ne précipite ni le calcium ni le magnésium et que les courbes obtenues selon les modalités précédentes ne diffèrent pas sensiblement des courbes traduisant l'action de la résine en l'absence de tartrate. Dans ces conditions, à l'équilibre, le rapport

Elément retenu dans le surnageant en $\mu\text{g/ml}$
complexant en mg/l

donne les valeurs suivantes pour le sérum :

Agents complexants	Ca	Mg
Citrate	5	1, 5
Tartrate	0, 5 - 0, 7	0, 16 - 0, 18

3 - 4 - Etude particulière du "phénomène citrate"

Les constatations faites lors des expériences avec addition de citrate comme agent complexant, sur la différence de comportement entre le sérum sanguin et le soluté artificiel, nous ont incité à étudier les facteurs influant sur les taux de magnésium et de calcium dissimulés vis-à-vis de la résine, en particulier :

- le pH de la solution de citrate ;

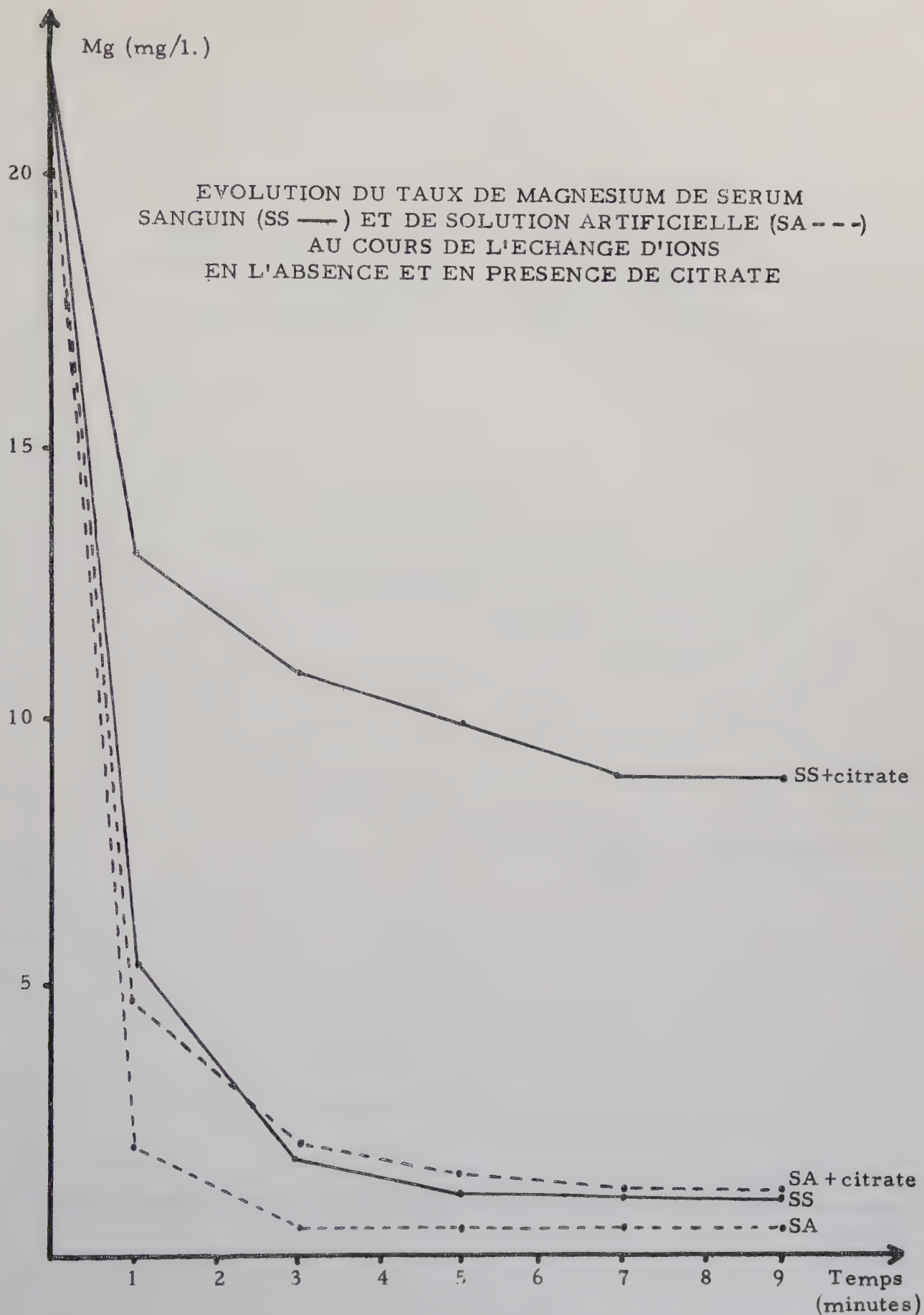


Figure 18

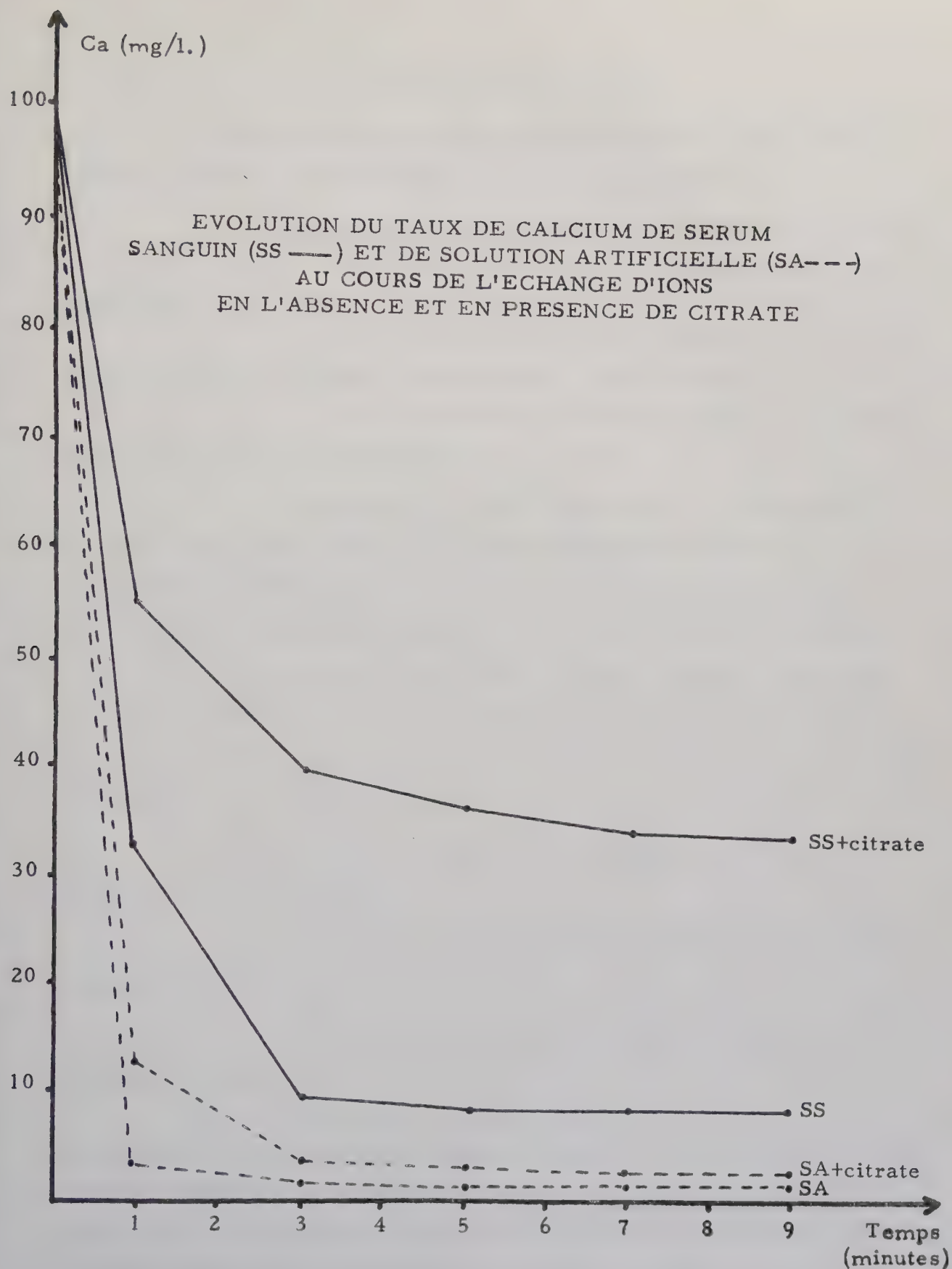


Figure 19

- les caractéristiques de la résine.

A la suite d'expériences préliminaires, nous avons établi le protocole suivant, pour la modification de chaque paramètre.

a) dans quatre fioles coniques, on introduit respectivement:

. 4, 5 ml de solution d'électrolytes + 0, 5 ml d'eau bidistillée ;

. 4, 5 ml de solution d'électrolytes + 0, 5 ml de soluté de citrate de sodium à concentration et pH variables.

. 4, 5 ml d'un pool de sérums humains + 0, 5 ml de citrate de sodium à concentration et pH variables.

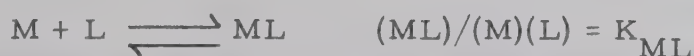
b) on prélève une partie aliquote pour la détermination du Mg et du Ca initial, soit 0, 2 ml, et on complète à 9 ml avec la solution de lanthane. On obtient ainsi une dilution finale du liquide primitif au 1/50^{ème} en tenant compte de l'addition de la solution de citrate de sodium.

c) on ajoute 1 g de résine en phase sodique (conservée sous solution de Na Cl à 9°/°, desséchée partiellement sur un filtre sans cendres avant la pesée), en même temps on déclenche le chronomètre et l'agitateur placé dans la fiole.

Les échantillons prélevés aux temps 1 - 3 - 5 - 7 - 9 minutes sont dilués au 1/25^{ème}.

3 - 4 - 1 - Variation du pH de la solution de citrate à concentration constante

A la notion de constante de stabilité définie par K de l'équation suivante :



(où M représente le cation et L l'agent complexant), on préfère en complexométrie celle de "constante conditionnelle" qui, mieux que la première, exprime qu'il ne s'agit pas d'une valeur fixe caractéristique de la réaction dépendant uniquement des éléments entrant en jeu, mais d'une variable

influencée par les conditions expérimentales (139) : nature et concentration des autres ions en solution, pH etc... La constante conditionnelle est formulée comme suit :

$$K' = K_{M'L'} = (ML)/(M')(L')$$

M' = concentration du métal non complexé, sous toutes ses formes ;

L' = concentration du complexant non lié au métal en question.

Dans l'expérimentation sur le sérum, l'influence des autres métaux susceptibles d'interférer dans les réactions de complexation du Ca et du Mg est à peu près constante ; par contre, le pH de l'agent complexant ajouté est d'une haute importance et mérite une étude attentive.

3 - 4 - 1 - 1 - Soluté d'électrolytes :

Sept expériences ont été réalisées avec le soluté d'électrolytes (4,5 ml) additionné de solution de citrate de sodium (0,5 ml d'une solution de citrate monosodique à 5 g/100 ml) ajustée à des pH différents ; l'ensemble étant mis en contact avec la résine, on procède au dosage du Mg et du Ca au cours du temps dans le surnageant. L'évolution des teneurs en Mg et en Ca pour chaque essai est représentée par les courbes des figures 20 et 21 . On constate que :

- la quantité d'élément complexé à l'équilibre diminue pour des pH allant de 8,10 à 4,20 (les pH indiqués sont ceux du milieu après addition du citrate).

- pour un pH égal ou inférieur à 4,20 et une concentration identique en citrate (5 g citrate/l de sérum), les taux de Ca et de Mg restant dans le surnageant du soluté artificiel s'abaissent à un taux à peine supérieur à celui obtenu en absence d'agent complexant. Ce phénomène s'explique par :

- . la faible stabilité des complexes : citrate de calcium et citrate de magnésium à ce pH ;

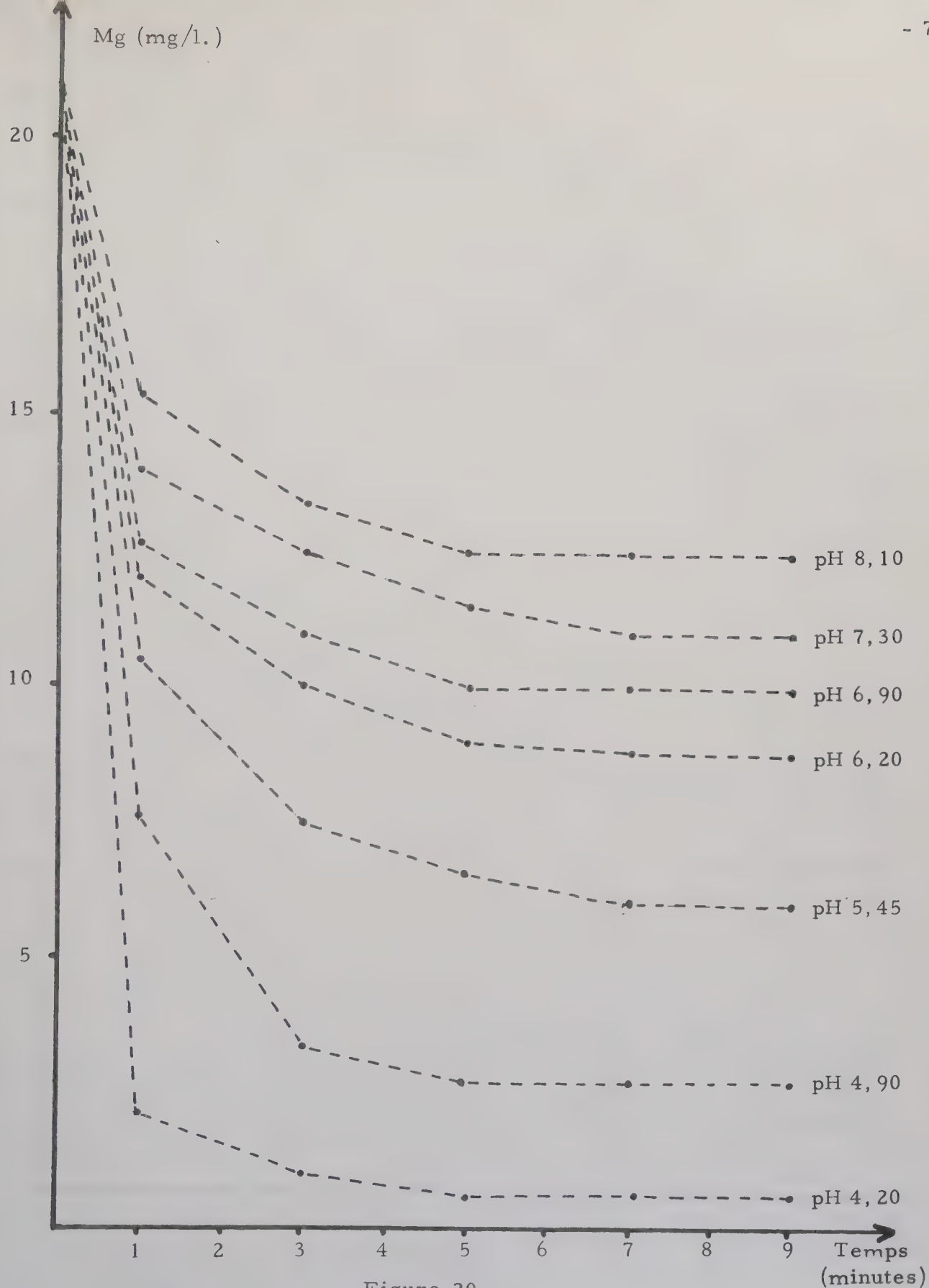


Figure 20

TAUX DE MAGNESIUM RETENU DANS LE SURNAGEANT
 AU COURS DU TEMPS POUR DIFFERENTS pH DE LA SOLUTION
 APRES ADDITION DE CITRATE

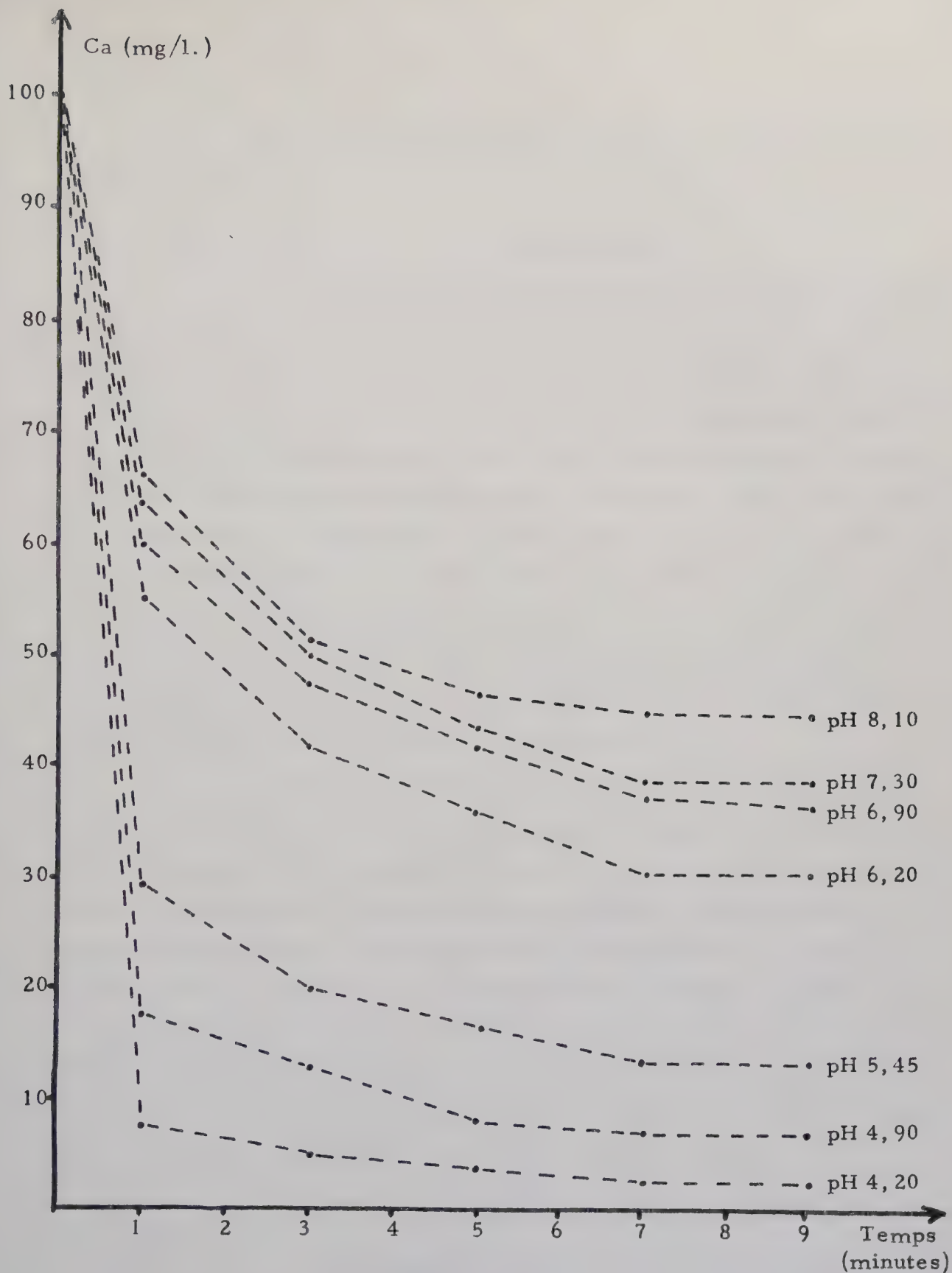


Figure 21

TAUX DE CALCIUM RETENU DANS LE SURNAGEANT
 AU COURS DU TEMPS POUR DIFFERENTS pH DU MILIEU APRES
 ADDITION DE CITRATE

. une activité d'échange plus grande de la résine cationique aux pH acides.

3 - 4 - 1 - 2 - Sérum sanguin :

Des expériences réalisées dans les mêmes conditions avec du sérum sanguin fournissent les courbes des figures 22 et 23. Celles-ci sont comparables aux courbes obtenues en milieu artificiel lorsque ce dernier présente un pH identique au sérum après addition de citrate. Le phénomène décrit précédemment, concernant les différences de comportement entre les solutions artificielles et le sérum peut donc être rapporté uniquement à l'effet de pH : en effet, une solution de citrate présentant un pH 4,20 additionnée à la solution artificielle acidifie notablement celle-ci (pH = 4,20) ; dans le cas du sérum sanguin, les protéines présentent un pouvoir tampon suffisant pour que le pH final reste voisin de 6,20. Or, les courbes obtenues à pH 6,20 avec la solution artificielle sont tout à fait comparables à celles fournies par le sérum sanguin.

Si dans l'expérience de SCHIRARDIN et METAIS l'augmentation de la quantité de citrate ne provoque plus à partir d'une certaine limite une augmentation parallèle du Ca dissimulé vis-à-vis de la résine, on ne doit pas impliquer l'épuisement d'une forme bien déterminée du Ca sérique (forme protéique), mais penser que la saturation de la capacité de complexation de l'ion citrate au pH considéré est atteinte. En effet, les courbes des figures 24, 25 traduisent les taux de Mg et de Ca à l'équilibre en fonction de la quantité de citrate ajoutée à différents pH. On constate que la pente des courbes représentatives s'élève avec le pH, et que, de plus, le plateau de saturation est atteint de plus en plus tard.

3 - 4 - 2 - Paramètres propres à la résine :

Nous avons conduit nos expériences préliminaires avec

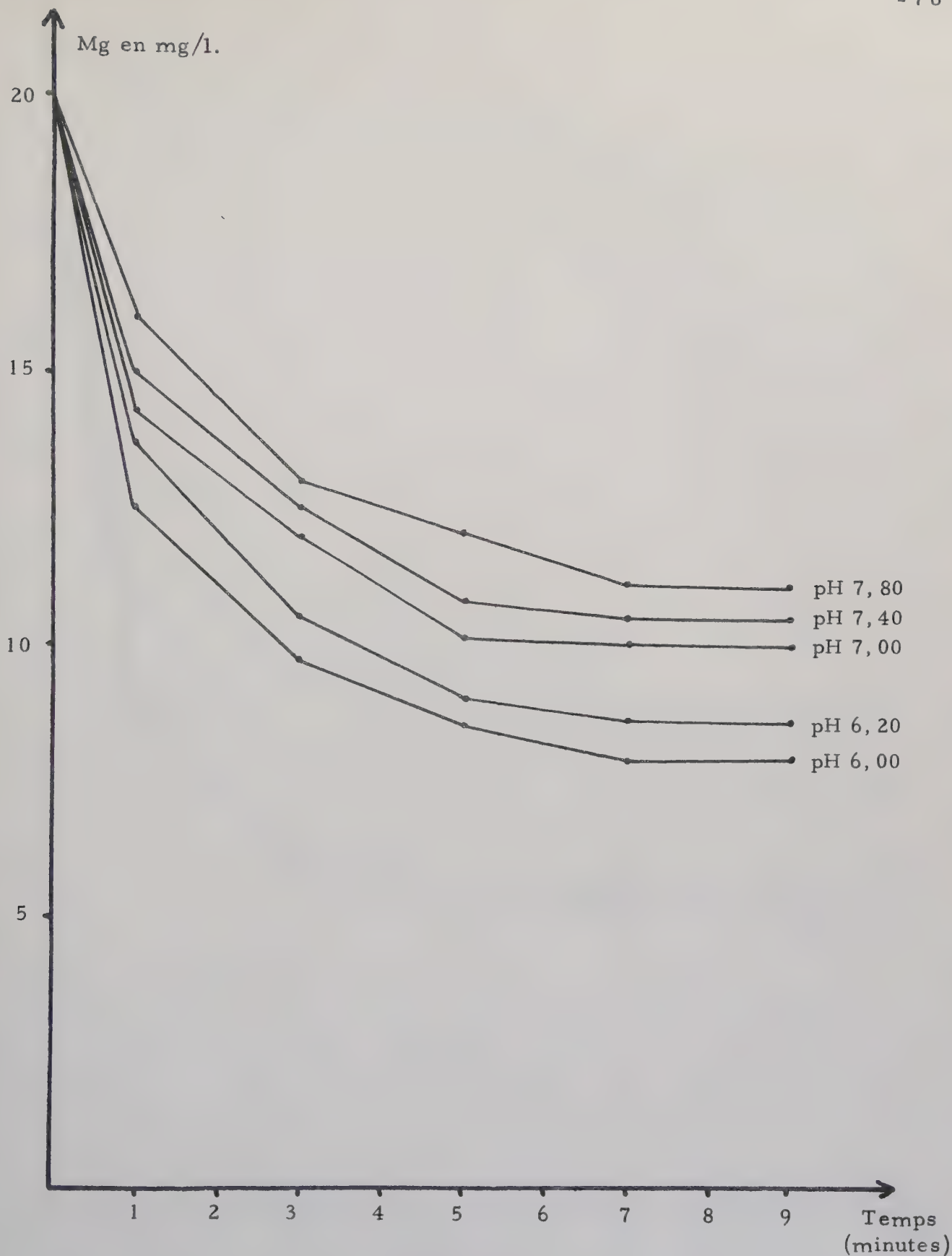
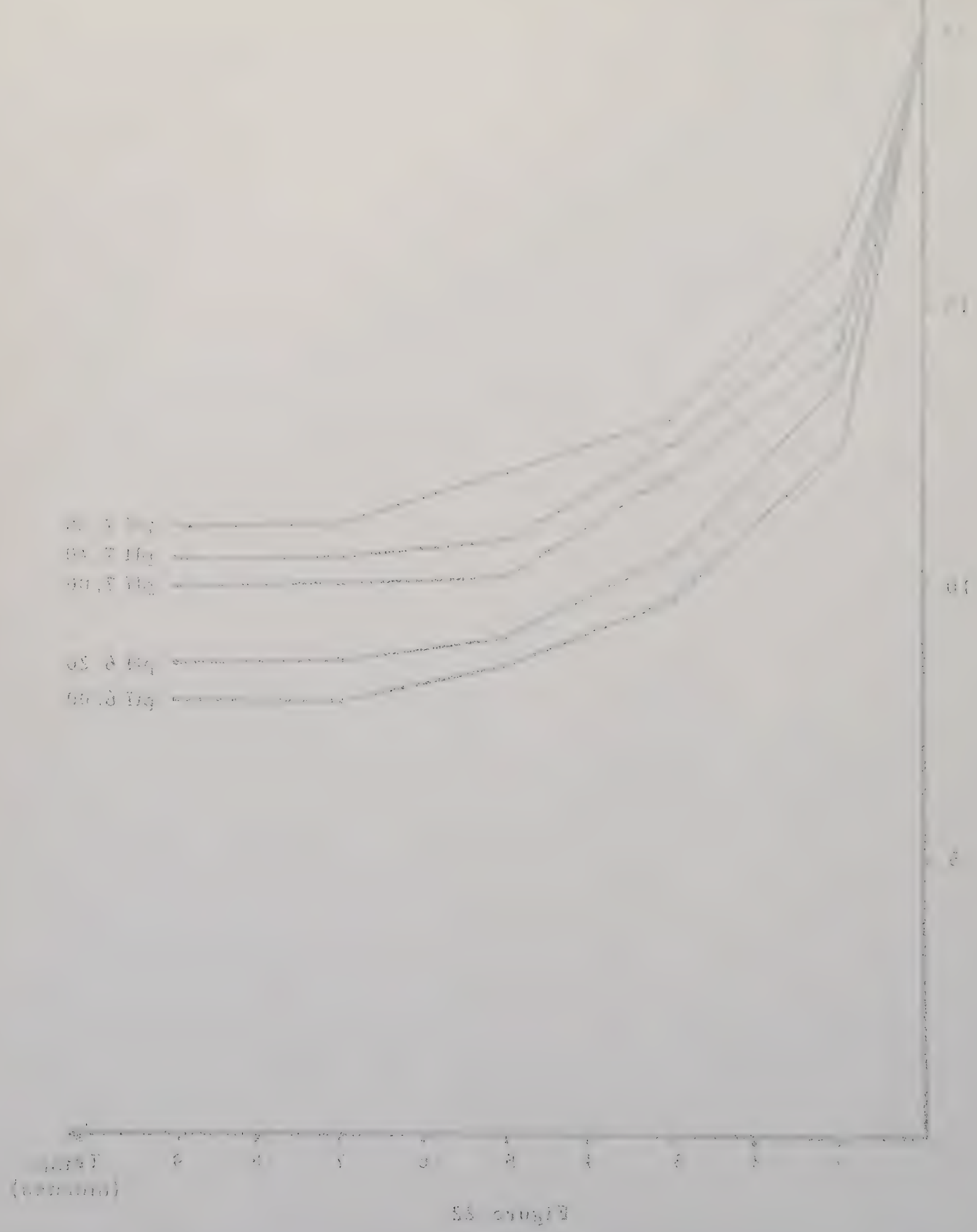


Figure 22

TAUX DE MAGNESIUM RETENU DANS LE SURNAGEANT AU COURS DU TEMPS
EN FONCTION DU pH DE LA SOLUTION EN PRESENCE DE CITRATE



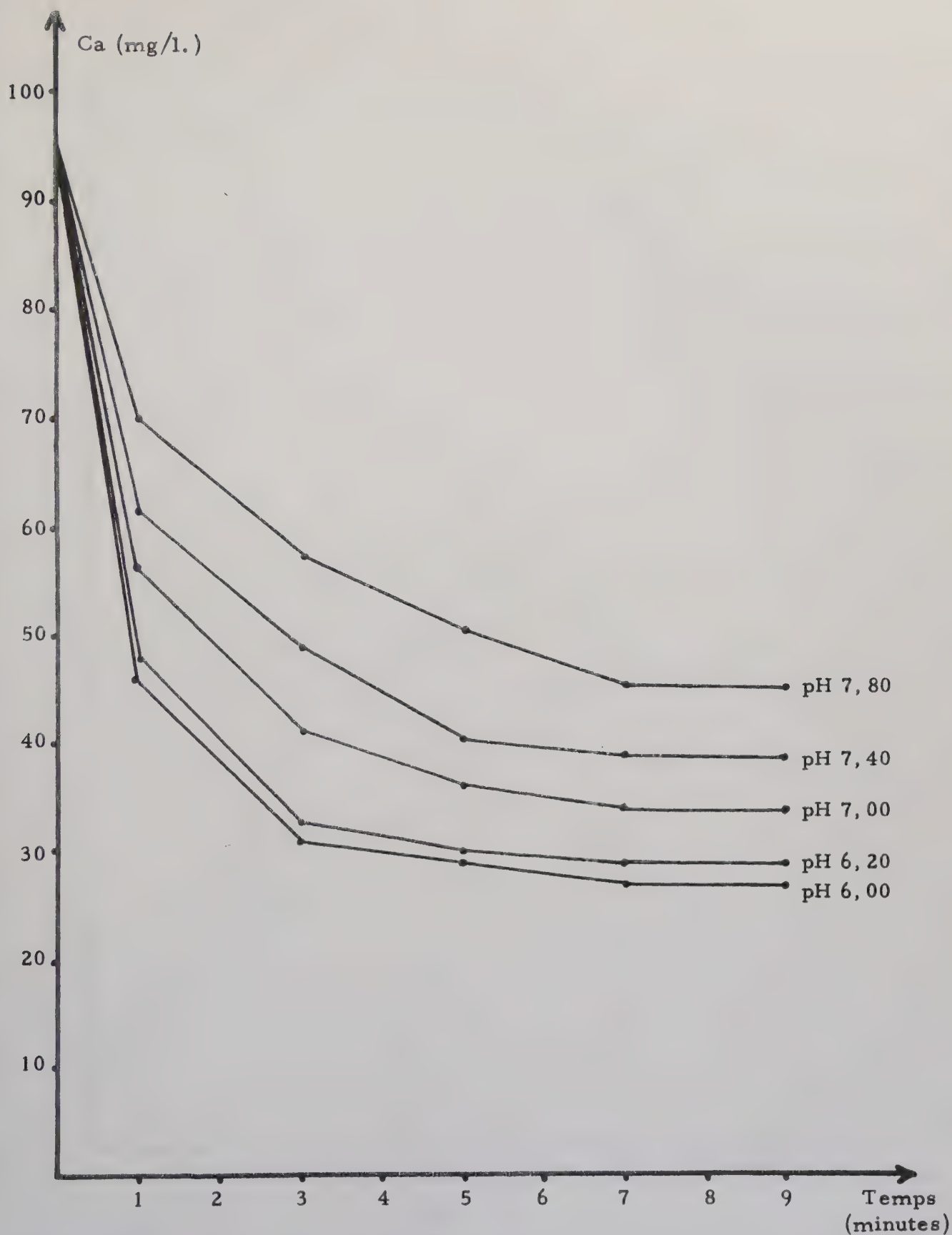


Figure 23

TAUX DE CALCIUM RETENU DANS LE SURNAGEANT AU COURS DU TEMPS
EN FONCTION DU pH DU MILIEU EN PRESENCE DE CITRATE

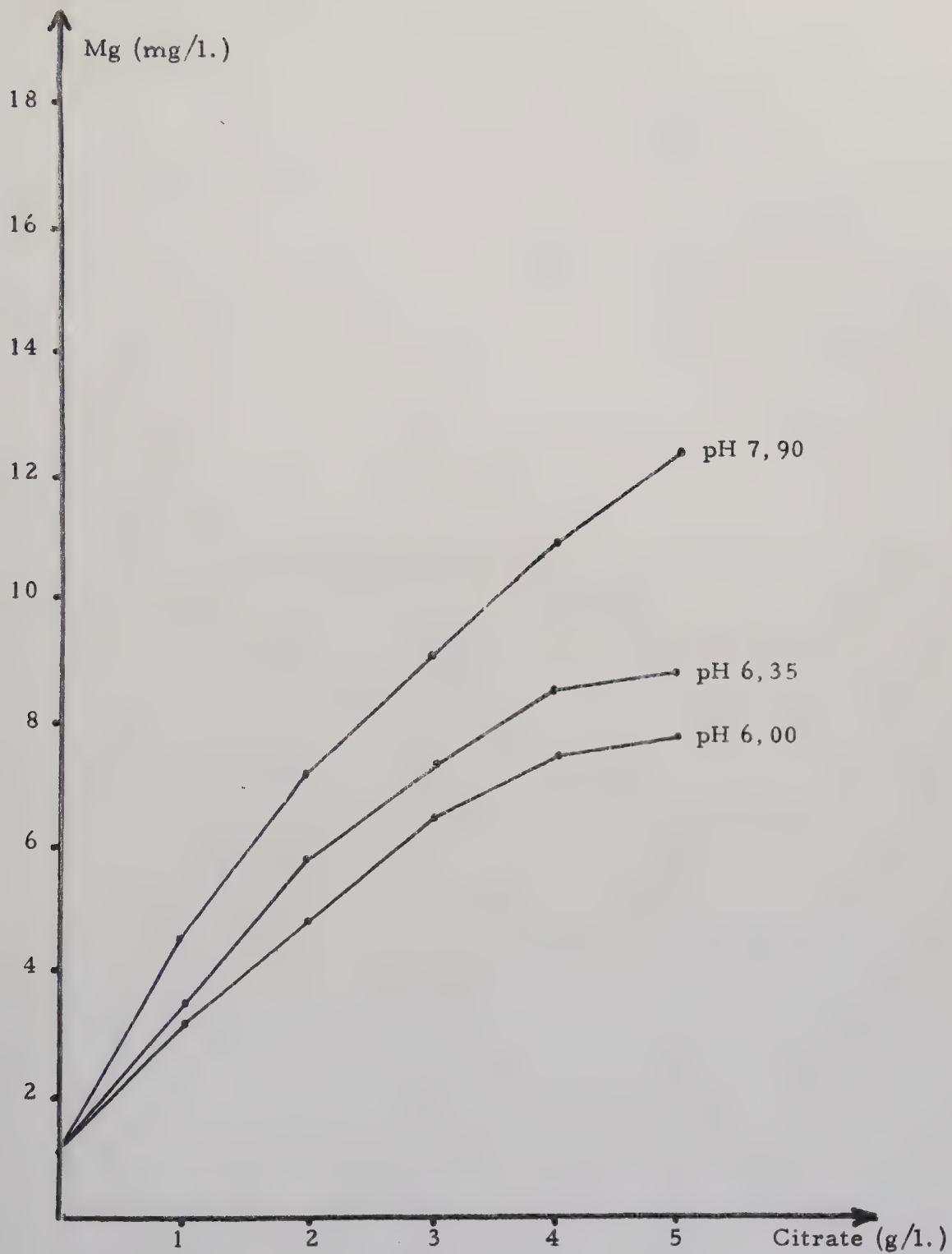


Figure 24

VARIATION DE LA TENEUR DU SURNAGEANT DE LA RESINE EN MAGNESIUM
EN FONCTION DE LA QUANTITE DE CITRATE UTILISE
POUR DIFFERENTS pH DU MILIEU

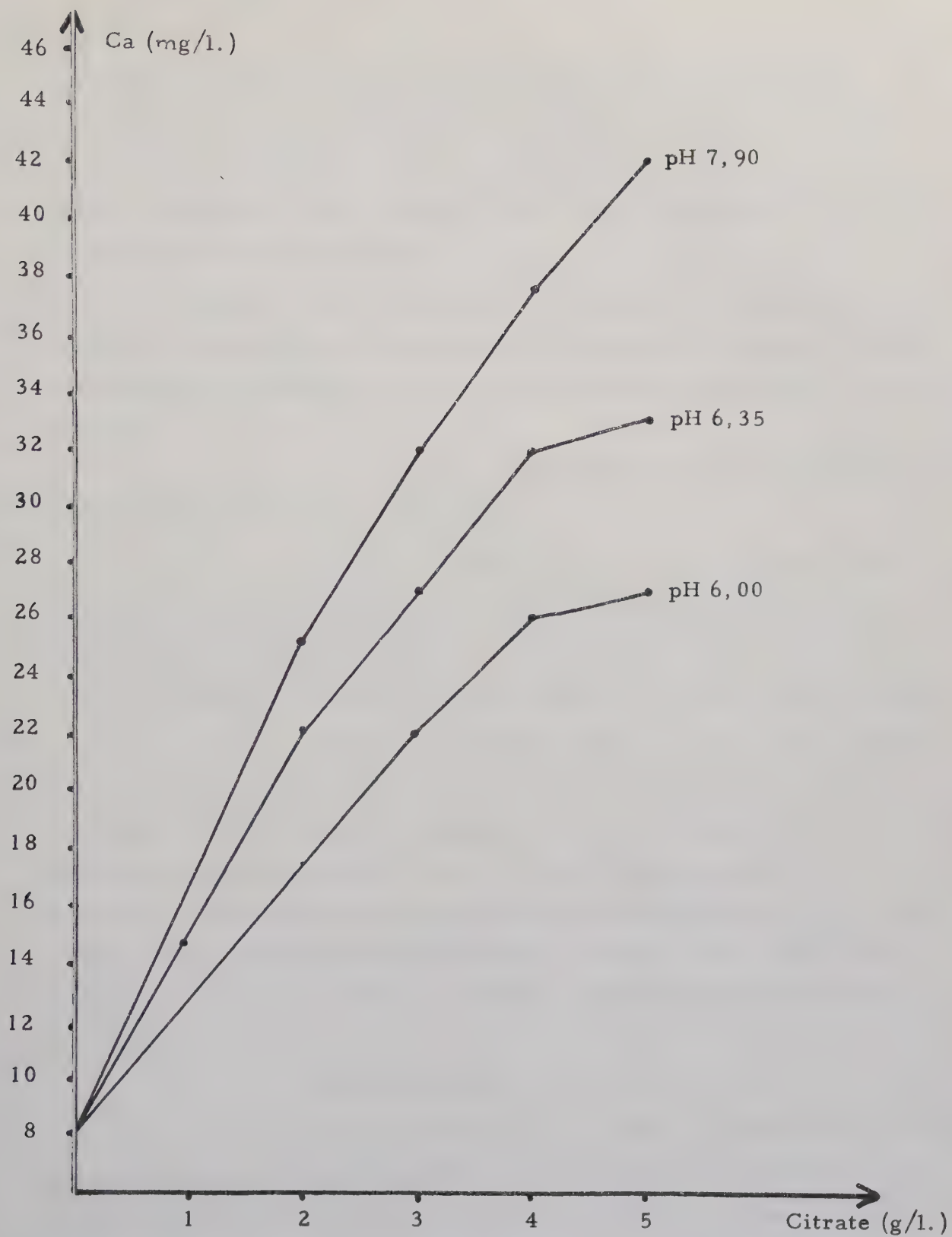


Figure 25

VARIATION DE LA TENEUR DU SURNAGEANT DE LA RESINE EN CALCIUM
EN FONCTION DE LA QUANTITE DE CITRATE UTILISE
POUR DIFFERENTS pH DU MILIEU

une quantité de résine choisie arbitrairement (1 g/5ml de solution) ; il convient d'apprécier dans quelle mesure les résultats étaient dépendants de cette quantité de résine, la vérification une fois faite, que, dans les conditions expérimentales primitives, la capacité de fixation de la résine n'était pas dépassée.

Ensuite, nous avons étudié l'influence de la saturation en ion alcalin de la résine et de la nature de l'ion alcalin fixé sur la résine sur l'ampleur des échanges avec les alcalino-terreux du liquide mis en contact.

3 - 4 - 2 - 1 - Vérification du pouvoir de fixation résiduel de la résine. 1^è expérience

Dans un premier temps, 4,5 ml de deux sérums différents sont mis en contact avec 1 g de résine en présence de 0,5 ml d'une solution de citrate de sodium à 50 g/l de pH = 4,20. Après 9 minutes, on récupère la résine des 2 essais puis on la lave à l'eau bidistillée.

Dans un deuxième temps, la résine ainsi récupérée est mise en contact avec 5 ml d'une solution de citrate de magnésium (du Codex) à 20 mg/l ; après 9 minutes, on dose le magnésium dans le surnageant de chaque nouvel essai. On trouve respectivement 0,25 et 0,23 mg, c'est à dire des valeurs pratiquement identiques. Si l'on renouvelle les deux mêmes expériences avec, cette fois, de la résine qui n'a pas encore servi, on obtient les mêmes valeurs de magnésium dans le surnageant.

2^è expérience :

Nous avons repris la même expérience en utilisant, pour le deuxième temps, les mêmes pools de sérums (1' et 2') que dans le premier temps (1 et 2) et en ajoutant de la même solution de citrate de sodium et dans la même proportion que dans le premier temps.

Les résultats des dosages de Mg et de Ca dans les surnageants au cours du temps sont consignés dans le tableau VIII .

TABLEAU VIII

			Mg (mg/l)					Ca (mg/l)				
		pH après résine	0	1 min.	3 m.	5 m.	9 m.	0	1 m.	3 m.	5 m.	9 m.
er temps	1	6,3	22,0	13,0	11,1	10,3	10,0	105	52	37,5	35	34
	2	6,3	20,5	13,5	10,0	9,7	9,3	102	50	36	34	33
e temps	1	6,2	22,0	16,0	15,5	15,0	15,0	105	59	55	50	50
	2	6,3	20,5	15,0	14,5	14,0	14,0	102	55	52,5	50	50

On remarque que dans le deuxième temps, l'Amberlite en phase sodique se révèle encore capable de fixer du Mg et du Ca, toutefois avec une vitesse moins grande et à un taux plus bas que dans le premier temps. Il est ainsi prouvé qu'au cours du premier contact la résine n'a pas été complètement saturée en magnésium et en calcium.

On se trouve assuré que la quantité de résine adaptée est suffisante pour fixer les formes échangeables, soit directement (forme ionisée) soit après rupture de liaison (forme protéique) des deux éléments métalliques.

3 - 4 - 2 - 2 - Effet de la saturation en ion alcalin de la résine :

Deux lots de résine sont utilisés : l'un est traité par la solution de chlorure de sodium à 9 g/l (résine Cl Na) (pH du surnageant = 6), l'autre est mis en présence de lessive de soude diluée de façon à obtenir un surnageant de pH = 7 (résine HONa).

Tableau III

	pH après résine	0	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	7 ml	8 ml	9 ml	10 ml
1	6,3	22,0	13,0	11,1	10,3	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
2	6,3	20,5	13,5	10,0	9,7	9,3	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
3	6,2	21,0	16,0	12,5	12,0	12,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
4	6,3	20,5	15,0	14,5	14,0	14,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

On remarque que dans le deuxième temps, l'Amberlite en phase sodique se révèle encore capable de fixer du Mg et du Ca, toutefois avec une vitesse moins grande et à un taux plus bas que dans le premier temps. On a ainsi prouvé qu'au cours du premier contact la résine n'a pas été complètement saturée en magnésium et en calcium.

On se trouve assurée que la quantité de résine adaptée est suffisante pour fixer les ions échangeables, soit directement (forme ionique) soit après rupture de liaison chimique (des deux éléments mélangés).

3 - 4 - 2 - 2 - Effet de la saturation en ion alcalin

Résine :

Deux lots de résine sont utilisés : l'un est traité par solution de chlorure de sodium à 9 g/l (résine Cl Na) (pH du surmuguant = 6), l'autre est mise en présence de lessive de soude diluée de façon à obtenir un surmuguant de pH = 7 (résine HONa).

TABEAU IX

		pH après résine	Mg (mg/l du surnageant en fonction du temps (minutes)					Ca (mg/l) du surnageant en fonction du temps (minutes)				
			0	1	3	5	9	0	1	3	5	9
Pool n° 1	résine (Cl Na)	6,0	105	37,5	27,3	25	25	22	10	7,4	6,8	6,5
	résine (Na OH)	6,2	105	50	30	28	28	22	12,2	8,8	7,9	7,6
Pool n° 2	résine (Cl Na)	6,2	108	46	36	32	30	24	13	10,3	9,75	9,5
	résine (Na OH)	6,4	108	51,5	39	36,5	35	24	12,5	11,4	10,7	10,5

En utilisant Ig d'Amberlite IR 120 ainsi préparé pour 4,5 ml de chacun des deux pools de sérums employés (1 et 2) et 0,5 ml de solution de citrate de sodium à pH = 4,15 et 50 g/l, nous avons obtenu les taux de Mg et de Ca suivants au cours du temps (tableau IX).

On voit que l'échange de Ca et de Mg est moins important quand la résine est parfaitement neutralisée avant son utilisation. On montre ainsi l'étroite influence du pH sur la cinétique de fixation par la résine des alcalino-terreux, qui, pour être interprétable, doit être réalisée dans des conditions strictement définies.

3 - 4 - 2 - 3 - Influence de la nature de l'ion alcalin (sodium et lithium) sur les échanges de Mg et de Ca avec la résine

La capacité de substitution d'un ion par un autre de même valence est fonction essentiellement de son rayon. La plupart des résines échangeuses d'ions fixent préférentiellement les ions de faible rayon à l'état solvaté. Par exemple, l'ion lithium qui est fortement solvaté (et qui, par suite, a un rayon plus important que celui du sodium malgré son numéro atomique plus faible) est un cation faiblement adsorbé (16)(17).

La saturation de la résine Amberlite IR 120 en phase H^+ avec du lithium s'obtient en agitant celle-ci avec une solution de chlorure de lithium jusqu'à ce que le pH du liquide surnageant reste identique au pH initial.

L'expérience d'échange d'ions réalisée comparativement avec cette résine en phase Li^+ et la résine en phase Na^+ , respectivement sur la solution d'électrolytes et sur le sérum conduit aux résultats du tableau X et des figures 26 et 27. .

Après contact de 9 minutes, le surnageant est plus pauvre en Mg et Ca dans le cas de résine en phase Li^+ que dans celle en phase

TABLEAU X

	Mg (mg/l)				Ca (mg/l)			
	Résine (Na ⁺)		Résine (Li ⁺)		Résine (Na ⁺)		Résine (Li ⁺)	
	Temps 0	Temps 9 min.	Temps 0	Temps 9 min.	Temps 0	Temps 9 min.	Temps 0	Temps 9 min.
sol. artif.	23	1,02	23	0,75	96	4,6	96	4,4
sérum	22	2,05	22	1,54	100	10,4	100	8,05

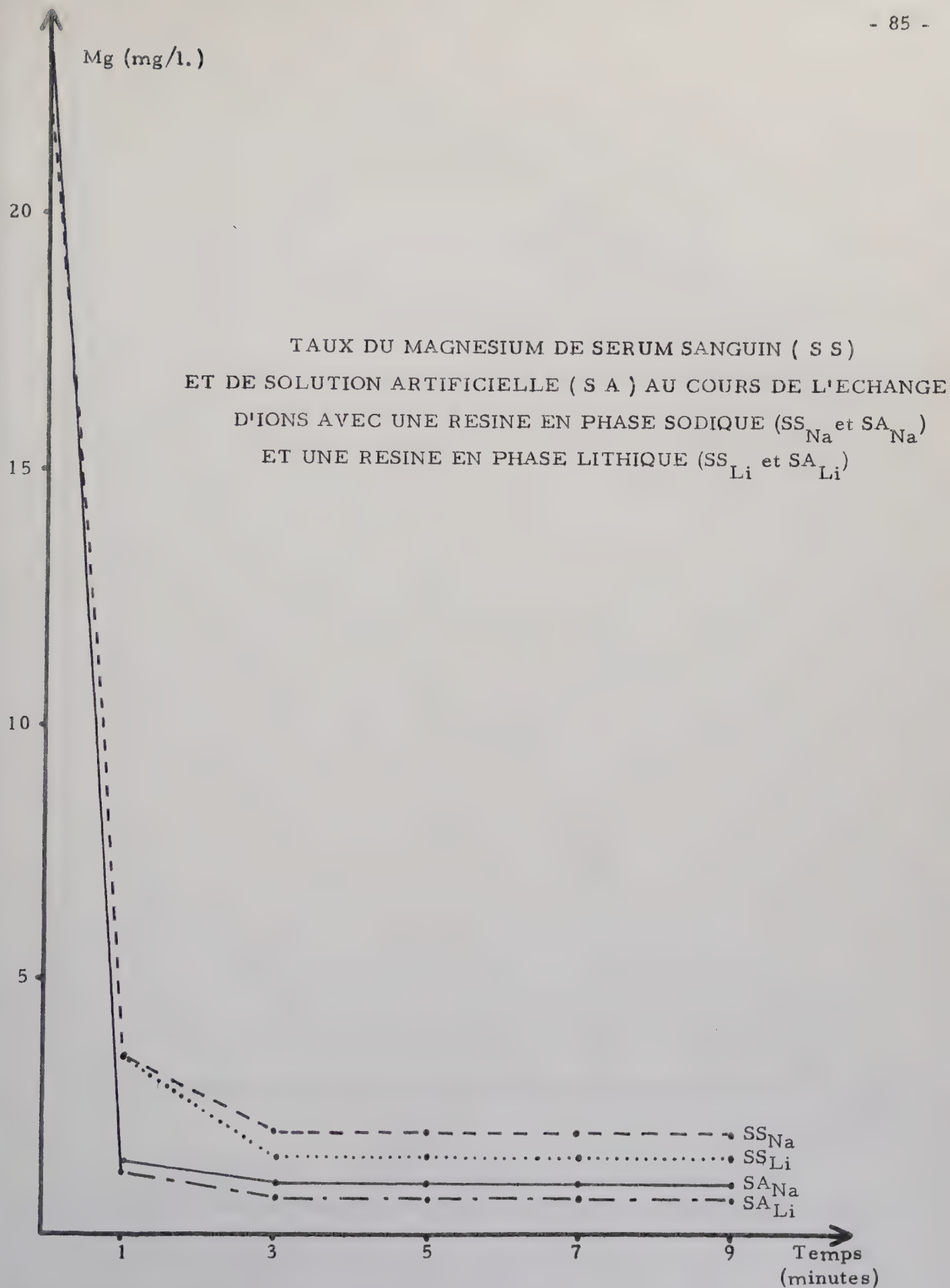


Figure 26

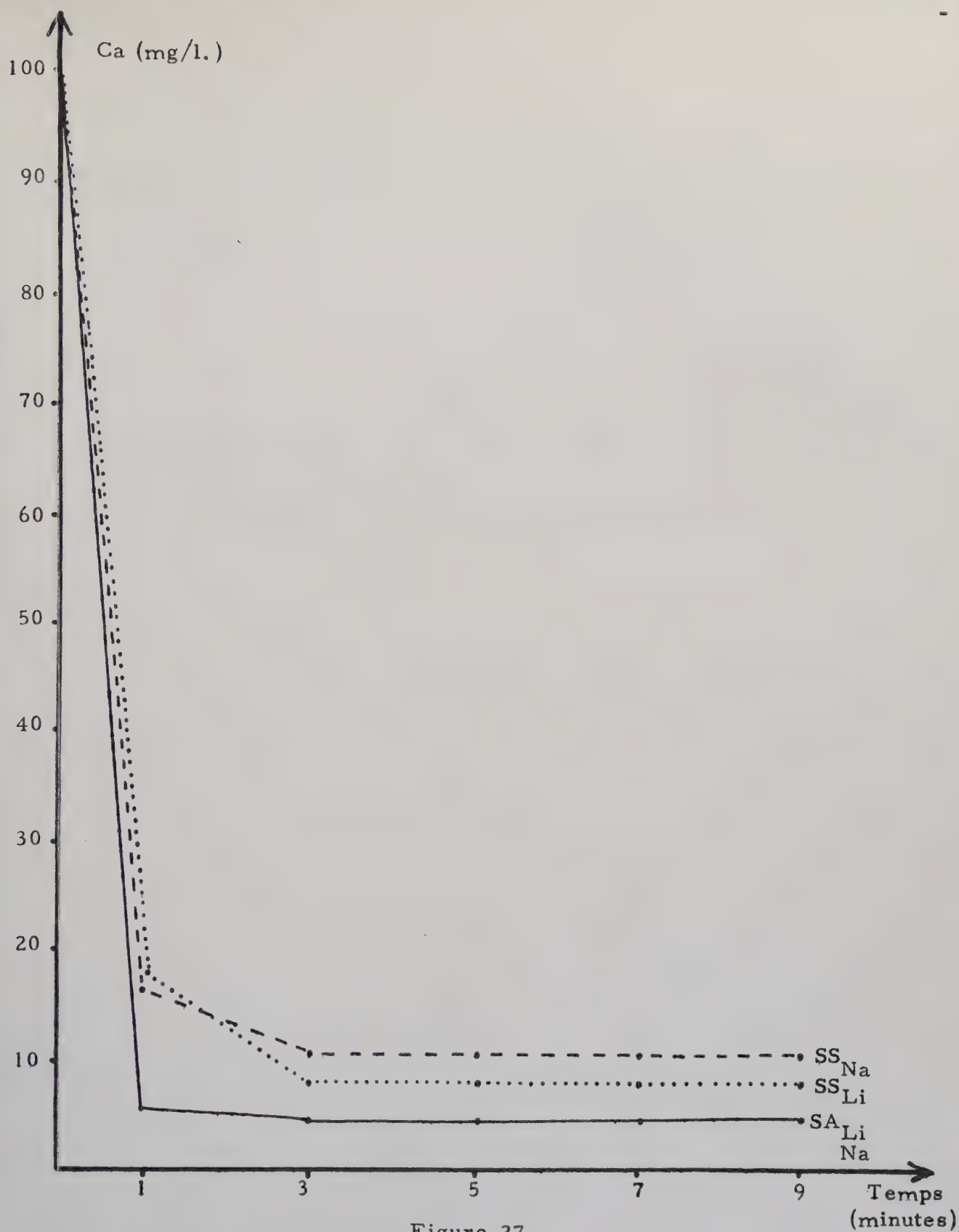


Figure 27

TAUX DU CALCIUM DE SERUM SANGUIN (SS)
 ET DE SOLUTION ARTIFICIELLE (SA) AU COURS DE L'ECHANGE D'IONS
 AVEC UNE RESINE EN PHASE SODIQUE (SS_{Na} et SA_{Na})
 ET UNE RESINE EN PHASE LITHIQUE (SS_{Li} et SA_{Li})

Na⁺ et ceci dans le rapport

$$\frac{\text{Mg (Li}^+)}{\text{Mg (Na}^+)} = 0,76$$

$$\frac{\text{Ca (Li}^+)}{\text{Ca (Na}^+)} = 0,77$$

3 - 4 - 2 - 4 - Influence du temps de contact :

Si on prolonge au-delà de 9 minutes le temps de contact du sérum sanguin avec citrate et résine, la teneur du surnageant en Ca et en Mg n'est pas modifiée. Le temps de 9 minutes constitue donc une limite supérieure pour l'atteinte de l'équilibre cherché.

TECHNIQUE DE DOSAGE DU MAGNESIUM SERIQUE NATURELLEMENT COMPLEXE :

Des expériences rapportées, nous proposons la technique suivante :

REACTIFS :

- Résine Amberlite IR 120 en phase sodique, équilibrée juste avant l'emploi avec une solution Na Cl à 9 g/l de pH ajusté à 7,40 avec de la soude diluée.

- Soluté artificiel : (voir page 55).

PROTOCOLE OPERATOIRE :

2,5 ml de sérum sanguin sont mesurés dans une fiole conique, placée sur un agitateur magnétique . On ajoute 0,5 g de résine, rapidement essorée sur un papier filtre sans cendre et on déclenche simultanément l'agitation et le chronomètre. 7 minutes et 9 minutes après, on prélève 0,5 ml du liquide surnageant qu'on dilue avec 4,5 ml de tampon spectral, et on dose par spectrométrie d'absorption atomique le Mg et, éventuellement, le Ca.

On opère comparativement avec la solution artificielle, et on déduit les valeurs trouvées avec celle-ci des chiffres obtenus avec le sérum.

CONCLUSION

L'ensemble des expériences précédentes montre la possibilité d'utiliser la résine Amberlite IR 120 en phase sodique pour apprécier quantitativement les formes de Mg et de Ca naturellement complexées dans le sérum et ultrafiltrables.

Il convient toutefois de tenir compte de l'observation suivante : cette appréciation sur le sérum doit s'effectuer toujours comparativement à celle d'un soluté artificiel d'électrolytes ; le surnageant résine-soluté d'électrolytes n'est pas comme on l'a montré absolument dépourvu de Mg et de Ca dont la présence résulte d'un équilibre entre phase résine et phase liquide en dehors de tout agent complexant.

Quant au Mg et au Ca non échangeables avec la résine après addition de citrate de sodium, il est difficile de les assimiler à des formes protéiques de ces éléments comme l'ont pensé METAIS et SCHIRARDIN. En effet, si on substitue au sérum sanguin la solution d'électrolytes précédente, on constate que pour des conditions de pH identiques on retrouve strictement dans le surnageant les mêmes quantités de Mg et de Ca que dans le cas du sérum.

CONCLUSION GENERALE :

De l'ensemble de cette étude, il se dégage les conclusions suivantes :

- La notion de "magnésium protéique", comme d'ailleurs celle de "calcium protéique", doit être considérée comme résultant d'un équilibre parfaitement réversible et extrêmement labile. Il ne s'agit absolument pas de molécules bien définies comme celle de la céruloplasmine qui comporte dans sa structure 8 atomes de cuivre solidement coordonnés.

- L'équilibre entre les fractions libres et les fractions protéiques est régi, pour une grande part, par la loi d'action de masse, la constante d'équilibre dépendant étroitement des paramètres physiques et de l'intégrité des structures protéiques. Tous les procédés de mesure modifiant les conditions physiques ou chimiques du prélèvement conduisent obligatoirement à des résultats entachés d'erreur. Il n'est donc pas étonnant que les valeurs fournies par les différentes techniques s'écartent sensiblement les unes des autres.

- En l'absence de procédé électrochimique suffisamment sensible pour apprécier l'activité des ions magnésium dans le sérum même, nous proposons donc les techniques suivantes :

. Détermination du magnésium diffusible par ultrafiltration accélérée par centrifugation en échelons puis appréciation de la concentration théorique par extrapolation à l'origine.

. Evaluation du magnésium complexé par la technique préconisée par SCHIRARDIN et METAIS pour le Ca complexé, modifiée. Tous les dosages du magnésium total, ultrafiltrable et complexé sont évidemment effectués par spectrophotométrie d'absorption atomique, seule technique, actuellement suffisamment sensible, pour permettre d'apprécier les faibles variations observées.

Les concentrations de magnésium diffusibles par la technique décrite montrent que, le plus souvent, les valeurs trouvées par les autres techniques ou par calcul à partir des taux respectifs de protéines et de magnésium sont satisfaisantes. Néanmoins, dans les cas d'anomalie de la formule protéique, des discordances peuvent être observées qui limitent la validité de ce mode simple d'expérience.

Quant à la chromatographie d'exclusion, elle ne peut fournir un procédé pratique de détermination des différentes formes physico-chimiques du magnésium et du calcium sériques, mais semble précieuse comme un moyen d'étude qualitatif et quantitatif des liaisons métal-protéines et des compétitions pouvant exister entre les cations vis-à-vis de l'ensemble des sites protéiques ou de certains d'entre eux.

DEUXIEME PARTIE

APPLICATION DES DONNEES ANALYTIQUES A L'ETUDE EXPERIMENTALE
DE CERTAINS ASPECTS DU METABOLISME DU MAGNESIUM

PREMIER CHAPITRE

REPARTITION PHYSIOLOGIQUE DU MAGNESIUM DE L'ORGANISME

Grâce aux progrès des techniques analytiques, l'exploration biologique des différents milieux de l'organisme permet, maintenant, de déterminer, pour chaque organe, la teneur exacte moyenne en magnésium, cation essentiellement intracellulaire. Cette connaissance est donc récente et correspond aux nouvelles préoccupations des biologistes et des physiologistes bien que l'importance du rôle du magnésium dans les processus enzymatiques soit étudiée depuis longtemps (ERDMAN (42) en 1927, LOHMANN en 1934 (93)).

Le plasma et les liquides intersititiels ne contiennent qu'une très faible partie du magnésium de l'organisme. La plus grande partie est située dans les cellules des tissus mous et surtout dans le squelette où cet élément semble se trouver sous une forme physiologiquement labile.

L'organisme humain renferme entre 300 et 500 mg de magnésium par kilogramme de poids corporel avec une valeur moyenne de 24 g pour un adulte pesant 70 kg (valeur allant de 19 g pour WALKER et Coll. (1949) à 28 g pour WIDDOWSON (1951)). Plus de 50 % de ce cation appartiennent au squelette, alors que la part des liquides extracellulaires ne dépasse guère 1 % du total (106). Le magnésium des tissus mous occupe la fraction intermédiaire.

En pathologie humaine la grande difficulté de l'exploration biologique réside, par conséquent, dans l'impossibilité d'extrapoler les résultats des dosages effectués sur le sang, au reste de l'organisme, presque cent fois plus riche en magnésium.

En outre, il est vraisemblable que tout le magnésium ne se trouve pas sous une forme physiologiquement active ou tout au moins immédiatement disponible.

C'est pourquoi, les recherches des analystes s'orientent maintenant vers la mise au point de méthodes aussi simples que possible permettant d'apprécier les taux des différentes formes physicochimiques du magnésium afin de mieux appréhender l'activité biologique et tenter d'expliquer les syndromes pathologiques rapportés à une carence en magnésium où pourtant le taux érythrocytaire peut rester normal.

Le tableau XI tiré des travaux de MAGNUS, LEVY (99), BROWN (19), CULLEN et WILKINS (32), donne la concentration moyenne en magnésium des principaux tissus mous du corps humain. Les chiffres sont exprimés en milligrammes de magnésium pour 100 g de substance fraîche. A titre de comparaison, les taux de calcium sont placés en regard :

TABLEAU XI

	magnésium mg/100 g	calcium mg/100 g
Peau	30	16
Muscle	18	7
Coeur	18	16
Rein	21	13
Foie	17	15
Cerveau	17	15
Pancréas	17	12
Rate	17	12
Surrénale	19	20
Poumon	16	7

Le dosage de magnésium dans les tissus de rats Wistar, jeunes adultes, après minéralisation par la technique précitée nous a fourni les résultats suivants :

	n	M(mg/100g)	σ	σ_M
Coeur	30	20,0	1,94	0,36
Rein	29	21,8	3	0,55
Muscle	27	22,9	4	0,80
Foie	13	24,2	1,7	0,48

n = nombre d'organes

M = valeur moyenne en mg pour 100 g de tissu frais

σ = écart type

σ_M = écart type à la moyenne

Le dosage de Ca tissulaire effectué parallèlement sur un certain nombre de ces organes a donné les valeurs moyennes suivantes :

	n	M mg/100 g	σ	σ_M
Coeur	20	8,9	2,5	0,5
Rein	19	12,3	2,1	0,4
Muscle	17	10,7	3,8	0,8
Foie	13	5,8	1,9	0,4

Parmi les tissus examinés, le foie paraît donc être l'organe le plus riche en magnésium et avoir la concentration la plus constante puisque son écart type est de 1,7 suivi du coeur avec un coefficient de variabilité de 2.

BRUCH, LAZZARA et YUN ont dosé le Mg de tissus frais

et de tissus desséchés chez le Chien. Ils ont noté que l'écart type n'était pas diminué dans ce dernier cas, ce qui prouve que les différences observées d'un animal à l'autre, ne semblent pas dues au degré d'imbibition d'eau. Les tissus riches en collagène ont des teneurs plus variables en Mg (23).

Il est enfin à remarquer que la plupart des tissus mous renferment plus de magnésium que de calcium, la différence étant très grande au niveau du foie.

- Le magnésium osseux :

Le squelette constitue la réserve la plus importante de magnésium. WOODS l'évalue à 70 %. L'os fonctionne comme volant régulateur du taux sérique et durant la croissance, le stock squelettique sert à suppléer aux besoins accrus de l'organisme.

Chez l'animal adulte, la labilité de ce dépôt a été mise en évidence au cours des expériences de carence. Néanmoins, si celle-ci se prolonge, la magnésémie, d'abord stable, tend à diminuer (40). Grâce au ^{28}Mg , HOLLENDER a pu constater que la quantité de magnésium qui est rapidement mobilisable en cas de déficit ne représente que 15 à 20 % de la totalité du magnésium de l'organisme, la majeure partie étant exclue des échanges métaboliques à court terme (70).

Les variations du magnésium selon l'âge, portent essentiellement sur le magnésium osseux qui atteint son maximum à la puberté (39).

Il s'y trouve sous forme de carbonate amorphe fixé aux cristaux d'hydroxyapatite.

- Le magnésium sanguin :

. sérum : Une étude statistique faite par F. ROUSSELET (144) sur 200 sérums de sujets apparemment sains, a fourni une moyenne de 21,4 mg/l, avec un écart type de 2 mg (spectrométrie d'absorption atomique). Cette

valeur se trouve très proche des chiffres admis comme normaux par la plupart des auteurs. La remarquable fixité du magnésium sérique dans les conditions physiologiques, confère toute leur valeur à de faibles variations relatives.

. magnésium érythrocytaire : Les valeurs normales sont les suivantes :

62,5 mg/l $\pm$ 4,4 par la méthode de précipitation phosphoammoniacale
(MAURAT (107))

64 $\pm$ 3,5 par la méthode complexométrique (DREUX et GIRARD (38))

56 $\pm$ 6 par la méthode d'absorption atomique (ROUSSELET et GIRARD (48)).

Les différences observées tiennent essentiellement au fait que la spectrométrie par absorption atomique ne nécessite pas une déprotéinisation préalable, celle-ci faussant par excès les résultats des techniques chimiques(48).

Le dosage de Mg érythrocytaire est le seul permettant en pratique l'évaluation du Mg cellulaire à la suite d'un prélèvement aisé. Mais il ne reflète certainement pas les fluctuations du Mg tissulaire.

Le globule rouge est une cellule en "survie" dont le potentiel enzymatique commandant les échanges métaboliques est fixé. Il n'y a pas de synthèse enzymatique possible dans les hématies à l'inverse des autres cellules où cette synthèse s'adapte constamment. Cependant, des cellules érythrocytaires d'âge différent coexistant, leur teneur électrolytique moyenne peut être considérée comme statistiquement représentative (106).

- Le magnésium des tissus mous :

Son taux varie de 18 à 24 mg pour 100 g de tissu frais ; il est environ de 2 à 4 fois plus important que celui du calcium et à peu près 10 fois plus élevé que celui du sérum.

- Forme sous laquelle se trouve

le magnésium dans les tissus mous : elle est encore mal connue.

Il semble qu'une partie soit ionisée, une autre liée aux constituants cellulaires. ENGELHARDT et LJUBIMOVA ont montré que les préparations de myosine ont la propriété d'hydrolyser les liaisons phosphates terminales de l'ATP, libérant ainsi de l'énergie utilisable pour la contraction musculaire.

Or l'activité enzymatique de la myosine est favorisée par le calcium et inhibée par le magnésium. Par contre, KIELLEY et MEYERHOFF ont rendu une enzyme sarcoplasmique responsable de cette activité ATPasique, mais qui serait inversement dépendante du magnésium et inhibée par le calcium.

Les échanges les plus lents se feraient au niveau du muscle squelettique et des érythrocytes. En revanche, la fixation du ^{28}Mg au niveau du muscle strié serait plus grande que les autres tissus (3).

Le passage du magnésium à travers la membrane cellulaire n'est pas un phénomène passif et son équilibre d'échange ou de translocation entre espaces intra- et extra-cellulaires dépend de systèmes enzymatiques et notamment des phosphorylases, influencées par le taux de sodium et de potassium. Le magnésium participe également à la régulation de ce même système enzymatique qui commande ses propres mouvements.

L'activité de la "barrière" située entre les espaces intra-cellulaires et extracellulaires peut se constater aussi bien in vitro. J. P. MAURAT et F. ROUSSELET ont observé en cours de réanimation chez 10 opérés recevant en perfusions 510 mg de magnésium par 24 heures, une élévation significative de la magnésémie (la moyenne passant de

21,85 mg/l à 25,14 mg/l) alors que le taux de magnésium érythrocytaire restait sensiblement constant (58,32 mg/l à 58,86 mg/l (110).

In vitro, l'activité de la paroi érythrocytaire peut être mise en évidence par la constatation suivante : lorsqu'on abandonne un sang recueilli sur anticoagulant, les ions, dont la concentration intracellulaire est plus grande que celle du plasma, ont tendance à diffuser dans celui-ci. La vitesse de transfert de potassium et du magnésium, éléments essentiellement intracellulaires, est nettement différente, tandis que celle du magnésium diminue progressivement ; celle du potassium s'accélère. (fig. 28) Ces résultats ont été obtenus chez l'Homme. Chez le Rat, il est plus difficile de tirer des conclusions en raison de l'extrême fragilité des érythrocytes de cet animal, qui s'hémo lysent même lorsqu'ils sont prélevés lors d'une très faible anesthésie à l'éther. Malgré cette restriction, l'augmentation du magnésium plasmatique semble moins importante que celle du potassium.

	1er jour	2e jour	5e jour
1	17,5	22	31
2	17	21	29,7
3	16	22,5	30
4	20	24,5	29,7

Mg PLASMATIQUE DU RAT (en mg/l) AU COURS DU TEMPS,
APRES CONSERVATION IN VITRO AU REFRIGERATEUR

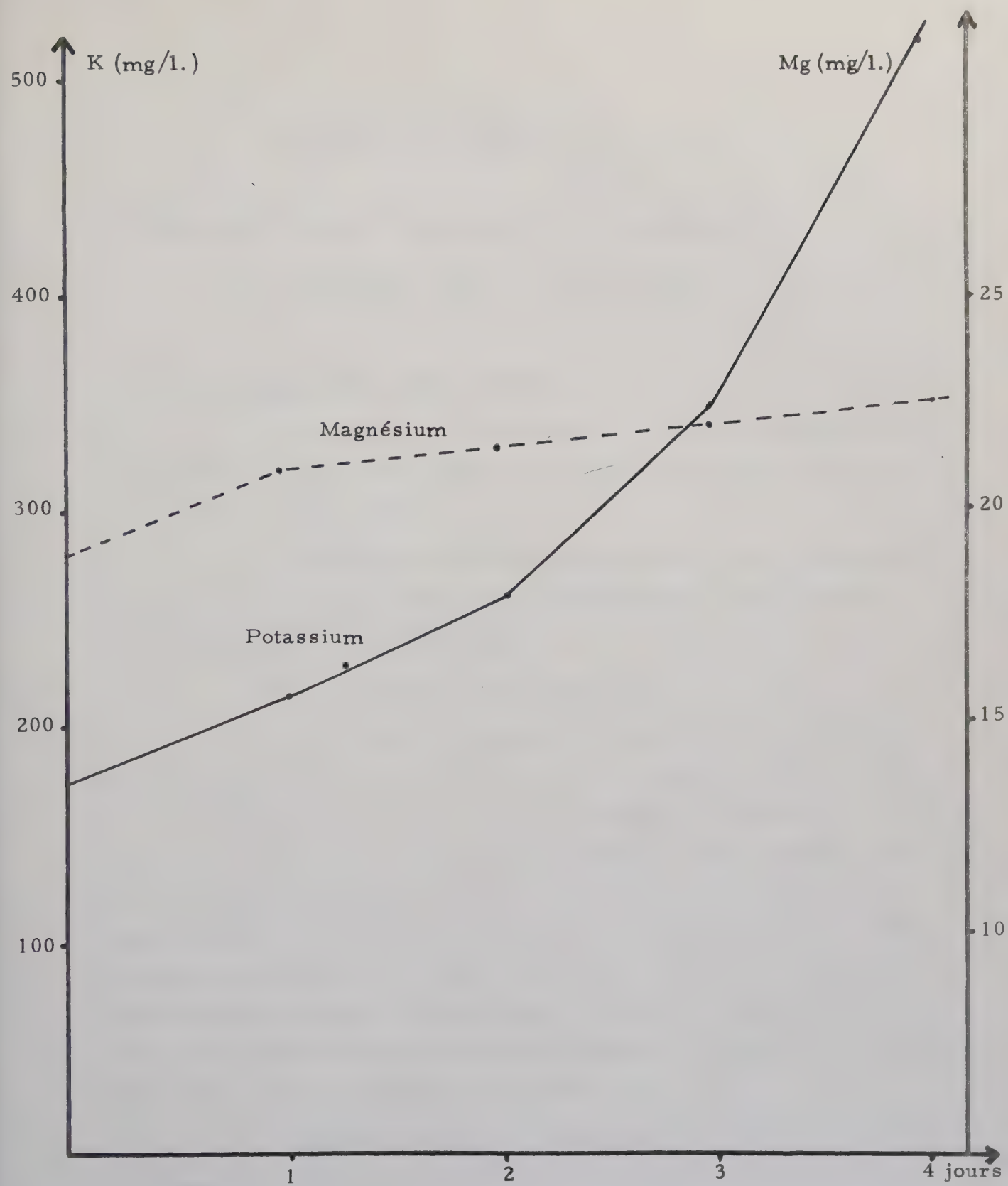


Figure 28

VARIATIONS MOYENNES DES TAUX
DE MAGNESIUM ET DE POTASSIUM EN FONCTION DU TEMPS

DEUXIEME CHAPITRE

INFLUENCE DE LA VITAMINE D ET DE LA THYROIDE

SUR LE METABOLISME DU MAGNESIUM

1 - ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

Le maintien de concentration normale de magnésium dans le sang dépend de l'équilibre entre l'absorption, d'une part, l'excrétion et le stockage, d'autre part.

Les travaux récents semblent montrer que la vitamine D comme les glandes parathyroïdes interviennent dans les mécanismes homéostatiques qui règlent cet équilibre.

1 - 1 - Surcharge en vitamine D

La vitamine D entraîne une augmentation corrélative de l'absorption intestinale du magnésium et de la magnésurie (88). HANNA retrouve ce phénomène chez des rats recevant de fortes doses de vitamine D₂ et un régime équilibré en Mg (55) ; cet auteur observe, en outre, une hypomagnésémie confirmée par ailleurs (133). Durant la période d'administration de vitamine D₂, les animaux présentent une balance magnésique positive, alors que les témoins, recevant la vitamine D₂ à des taux physiologiques, ont une balance légèrement négative ; donc l'absorption intestinale en régime hypervitaminique compense la magnésurie puisque dans ce cas, la balance est positive (134).

RICHARDSON et Coll. reprennent l'expérience : des rats sont soumis à un régime carencé en Mg, et certains reçoivent de la vitamine D₂ en solution dans l'huile de sésame. Le régime hypomagnésique a pour but d'accentuer les différences des excrétions, urinaire et

fécale, des animaux qui reçoivent de la vitamine D₂ et de ceux qui n'en reçoivent pas. Ces auteurs n'ont observé aucune différence significative au cours de cette expérience (133). Cette observation relègue au second plan l'intervention de la vitamine D₂ sur l'absorption et l'excrétion intestinales comme sur l'excrétion urinaire dans la production de l'hypomagnésémie. En outre, l'absence de différence entre les taux de protéines sériques de ces deux groupes d'animaux, exclut l'effet d'une éventuelle hémodilution. RICHARDSON et Coll. ont suggéré l'existence d'une hypomagnésémie induite par la redistribution de la phase extracellulaire vers les tissus, en particulier vers l'os, hypothèse confirmée chez le Poulet par WORKER et Coll. (187).

L'hypomagnésémie, induite par la vitamine D, a été retrouvée chez l'Homme (62) ; HEATON et Coll. l'attribuent à une action proportionnellement plus grande sur l'absorption du Ca que sur celle du Mg au niveau de l'intestin et des tubules rénaux, ce qui serait en accord avec la notion de compétition pour un siège commun de transport. Le même phénomène serait observé après administration accrue de calcium.

1 - 2 - Interrelations entre vitamine D et parathyroïdes

WALLACH et Coll. ont repris l'expérience chez le Chien adulte en administrant quotidiennement à cet animal 100 000 à 200 000 U de calciférol, pendant cinq semaines. Al'aide de ²⁸Mg, ces auteurs observent une décroissance de la radioactivité du plasma accélérée par la vitamine D₃ ; tandis que la magnésémie s'abaisse, le foie, le pancréas, l'os s'enrichissent en Mg de 16 à 20 %. Pour WALLACH et Coll., la vitamine D₃, comme la parathyroïde, stimule le transport cellulaire du Ca et du Mg. Cependant, la différence quantitative des effets de ces agents sur la distribution de cations divalents (le Ca hépatique ne change pas) et l'incapacité de la vitamine D à s'opposer à la concentration cellu-

laire de phosphore et d'ions monovalents, suggèrent que des loci et/ou des modes d'action différents sont à la base les effets de la vitamine D et de la parathormone (PTH).

On trouvera résumés dans le tableau XII, les résultats tirés des observations de différents auteurs.

La vitamine D et la parathormone, malgré l'effet inhibiteur de l'hypercalcémie qu'elles induisent, augmentent l'influx cellulaire du Mg ; ceci confirme l'hypothèse de RICHARDSON et WELT. De plus, elles sont connues pour avoir une action synergétique sur la résorption osseuse.

En outre, on avait remarqué que la carence en vitamine D entraînait une hypertrophie des parathyroïdes, non seulement en volume mais aussi en activité fonctionnelle mesurée par fixation de l'acide α amino-isobutyrique ou observée au microscope électronique (118). ROTH et Coll. ont démontré que l'activité parathyroïdienne dépend plutôt du taux de la calcémie et du rapport $\frac{Ca}{P}$ que de la présence ou de l'absence de la vitamine D. En effet, des rats à P calcémie basse ont la parathyroïde stimulée, avec ou sans vitamine D ; l'inverse s'observe dans le cas d'hypercalcémie (143). Il semble que le niveau du calcium ionisé contrôlerait la synthèse et la sécrétion de la parathormone.

1 - 3 - L'avitaminose D :

L'avitaminose D n'a pas d'incidence connue sur le métabolisme du magnésium, mais, lors de la carence magnésique, elle prévient l'apparition de l'hypercalcémie et des dépôts calciques qui ne surviennent pas d'ailleurs en l'absence des parathyroïdes. On a émis l'hypothèse que l'activité parathyroïdienne, en particulier son action ostéolysante, ne pourrait se développer complètement qu'en présence de vitamine D.

TABLEAU XII

ACTION DE L'HYPERCALCEMIE IDIOPATHIQUE, DE L'HYPERTHYROIDIE,

DE LA VITAMINE D SUR LE TRANSPORT DE CERTAINS ELEMENTS

	Pénétration de cell. de Ca	Pénétration de cell. de Mg	Pénétration de cell. de Na	Sortie cell. de K	Sortie cell. d'eau	Sortie cell. de Cl	Sortie cell. de F
Hypercalcémie idiopathique	+	-	-	-	+	+	+
Hyperparathyroïdie	+	+					favorise rentrée
Vitamine D	+	+	0	0		0	0

+ = favorise

- = empêche

0 = action nulle

L'effet protecteur de l'avitaminose D contre les effets hypercalcémiantes de la carence en magnésium, a donc été proposé comme un argument indirect en faveur de la responsabilité des parathyroïdes dans le développement de ces effets.

Des observations antérieures chez le Rat et la Chèvre suggèrent que la déficience en Mg interfère avec l'équilibre calcique et que les besoins en vitamine D chez l'animal en carence magnésique, sont plus grands que chez le témoin. Inspirés de ces travaux, LIFSHITZ, HARRISSON et HARRISSON ont mesuré la concentration de calcium transporté à travers l'intestin de rats déficients, respectivement : en vitamine D - en vitamine D et en Mg, comparativement à des animaux témoins. Ces auteurs ont trouvé que les rats déficients en Mg sont moins réceptifs aux taux physiologiques de vitamine D que les témoins (91). La vitamine D, stérol provoquant l'absorption optimale de Ca, est en rapport avec l'apparition de "Ca BP" (Calcium Binding Protein) (178). Ces protéines vitamine D dépendantes, ont été découvertes dans l'intestin grêle et les reins de Poussin ; elles ont une grande affinité pour le Ca et interviennent intimement dans le transfert de cet élément à travers l'épithélium intestinal. Le système régulateur de la synthèse de Ca BP est encore inconnu (179), mais nous pensons que le magnésium pourrait y jouer un rôle, et c'est pourquoi, son absence entraînerait une diminution de la sensibilité de l'animal aux taux physiologiques de vitamine D.

1 - 4 - Effets de la thyroïde sur le métabolisme du Mg :

Les relations entre le métabolisme du Mg et le fonctionnement thyroïdien, ont fait l'objet de nombreuses études dont tous les résultats ne sont pas concordants. Dès 1939, SOFFER et Coll. avaient remarqué dans l'hyperthyroïdie, une diminution du Mg ultrafiltrable au profit du Mg lié (159) ; les chiffres normaux sont rétablis par le traitement iodé

ou la thyroïdectomie subtotale. Un rapport inverse retrouvé dans les hypothyroïdies et chez les chiens thyroïdectomisés, est ramené à la normale par l'administration d'extraits thyroïdiens. Plusieurs études mettent en évidence une augmentation du Mg plasmatique dans l'hypothyroïdie et une baisse dans l'hyperthyroïdie (37)(170) ; mais de récents résultats obtenus par HIROCHI OTO (68), controversent ceux de SOFFER. Pour l'auteur japonais, la principale cause de l'hypomagnésémie dans l'hyperthyroïdie reviendrait à l'augmentation de l'élimination urinaire ; comme la concentration plasmatique a une influence sur la magnésurie, il étudie de préférence la clearance du magnésium qu'il trouve augmentée dans l'hyperthyroïdie ; le rapport inverse entre la protéinémie et la clearance de Mg fait suggérer à cet auteur que l'augmentation de la clearance magnésienne dans l'hyperthyroïdie, résulte de l'augmentation de la fraction ultrafiltrable ; l'inverse se produisant dans l'hypothyroïdie. PRASAD (126) et DINE (36), par contre, observent une diminution du magnésium ultrafiltrable dans l'hyperthyroïdie, et une augmentation dans l'hypothyroïdie. Dans ces conditions, il devient difficile d'expliquer les modifications de la clearance de Mg en fonction du taux d'ultrafiltrable au cours du dysfonctionnement thyroïdien. Quoiqu'il en soit, l'administration de thyroxine aux animaux entraîne une diminution de magnésurie (2).

JONES et Coll. retrouvent l'hypermagnésémie dans l'hypothyroïdie (75), déjà notée chez l'Homme par WALLACH et Coll. comme une hypomagnésémie dans l'hyperthyroïdie (177), ces anomalies étant promptement corrigées par la thérapeutique appropriée (140).

La fixation de ^{28}Mg par les tissus et le pool échangeable de magnésium, seraient augmentés dans l'hyperthyroïdie et

diminués dans l'hypothyroïdie (2) (5) (6). Tout ceci semble indiquer une diminution des possibilités de passage du magnésium à travers la membrane cellulaire dans l'hypothyroïdie, et, à l'inverse, une stimulation du transport cellulaire du magnésium sous l'influence de l'hormone thyroïdienne. En conjonction avec l'influence directe de la concentration extracellulaire anormale du magnésium sur son transport (174), une stimulation du transport intracellulaire par l'hormone thyroïdienne peut protéger les cellules contre une déplétion de Mg dans l'hyperthyroïdie.

Les déterminations du magnésium érythrocytaire ont également donné lieu à des interprétations variables : non modifié, pour les uns (75), le taux est, pour d'autres, diminué dans l'hyperthyroïdie et augmenté dans l'hypothyroïdie (140); J. P. MAURAT et F. ROUSSELET (110), ont trouvé des résultats concordants avec cette dernière opinion. Mais, il n'a pas été noté de parallélisme entre la gravité de la maladie et les variations des taux sanguins du Mg.

2 - EXPERIENCES PERSONNELLES

Il nous a paru intéressant de poursuivre une expérimentation animale, à peine ébauchée par ailleurs, sur les effets de l'hypervitaminose D sur la teneur en magnésium et en calcium, en nous attachant essentiellement aux organes suivants : coeur, rein, muscle squelettique du Rat et en mettant à profit :

- les qualités d'extrême sensibilité de la spectrophotométrie d'absorption atomique permettant le dosage précis du magnésium et du calcium sur un fragment d'organe, même de taille inférieure à 0,5 g.

- des possibilités d'étude de l'incidence de la surcharge en thyroxine et de la radiothyroïdectomie sur les mêmes effets de l'hypervitaminose D.

2 - 1 - Conduite des expériences :

Nous avons effectué successivement trois séries d'expériences sur les rats Wistar mâles, dont le poids moyen, en début d'expérimentation, était de 190 g. Ces séries diffèrent entre elles, uniquement par la dose, le mode d'administration et la nature de la vitamine D.

- la première série reçoit une injection intrapéritonéale de 240 000 U de vitamine D₃ en 60 jours ;

- la deuxième série est traitée avec une dose deux fois moindre de vitamine D₃ ;

- les animaux de la troisième série ont reçu 680 000 U de Stérogyl (vitamine D₂) en un temps plus long (3 mois) par voie intrapéritonéale sauf pour le lot radiothyroïdectomisé qui fut traité per os avec 320 000 U de vitamine D₂.

Pour chacune de ces séries, les rats, tous soumis au même régime standard d'aliments composés et d'eau pure à volonté, sont divisés en 6 lots :

- . le lot n° 1 correspondant aux animaux témoins normaux ;

- . le lot n° 2 subit la seule administration de vitamine D

- . le lot n° 3 reçoit immédiatement, avant le début d'administration de la vitamine, une injection de 450 µc d'¹³¹I pour induire une radiothyroïdectomie.

- . le lot n° 4 est traité pendant les sept derniers jours de l'expérimentation, par injection quotidienne sous-cutanée de 0,5 mg de D L Thyroxine (T 4).

- . le lot n° 5 destiné à être comparé au lot n° 4 reçoit la même dose, pendant le même temps, de D L Thyroxine, mais n'est pas

soumis à la surcharge en vitamine D.

enfin, le lot n° 6 reçoit, pendant la même période, et chaque jour, 5 mg de benzyl thiouracile (BTU) en injection sous-cutanée. On sait que cette substance inhibe la sécrétion endogène de la thyroïde sans mettre au repos les cellules principales de cet organe.

A la fin de l'expérience, les animaux sont sacrifiés par décapitation sous anesthésie à l'éther sulfurique, après prélèvement de sang intra-cardiaque. Les dosages de magnésium et de calcium dans le sang et les organes précités, sont effectués par spectrophotométrie d'absorption atomique après digestion nitro-perchlorique.

Chez les animaux ayant reçu de l' ^{131}I , la réalité de la thyroïdectomie totale a systématiquement été vérifiée histologiquement sur coupes sériées, en même temps qu'était appréciée l'intégrité des parathyroïdes dans le laboratoire du Professeur C. BUGNON de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Besançon^x.

2 - 2 - Résultats :

Ils sont exprimés en milligramme de magnésium ou de calcium pour 100 g de tissu frais.

2 - 2 - 1 - Surcharge en vitamine D :

2 - 2 - 1 - 1 - Teneur en magnésium :

1ère série : la surcharge en vitamine D₃ chez 10 rats (chacun 240 000 U en 60 jours) montre, par rapport au lot de 17 rats témoins, un net accroissement de la teneur en magnésium du coeur, du rein, alors que celle du muscle reste beaucoup plus faible et sans signification statistique comme en témoignent les résultats reportés dans le tableau XIII et la figure 29.

^x Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur BUGNON pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et les résultats histologiques communiqués.

TABEAU XIII

TENEUR EN Mg DES ORGANES D'ANIMAUX TEMOINS SOUMIS A LA VITAMINE D₃

LOTS	COEUR			REIN			MUSCLE		
	n	M	σ	σ_M	n	M	σ	M	σ_M
N° 1 Témoins	17	19,29	2,35	0,57	17	19,56	4,20	21,22	0,97
N° 2 vitamine D ₃	10	21,49	2,00	0,64	11	25,00	2,6	23,18	1,04

n = nombre d'animaux

m = valeur moyenne

σ = écart type

σ_M = écart type à la moyenne

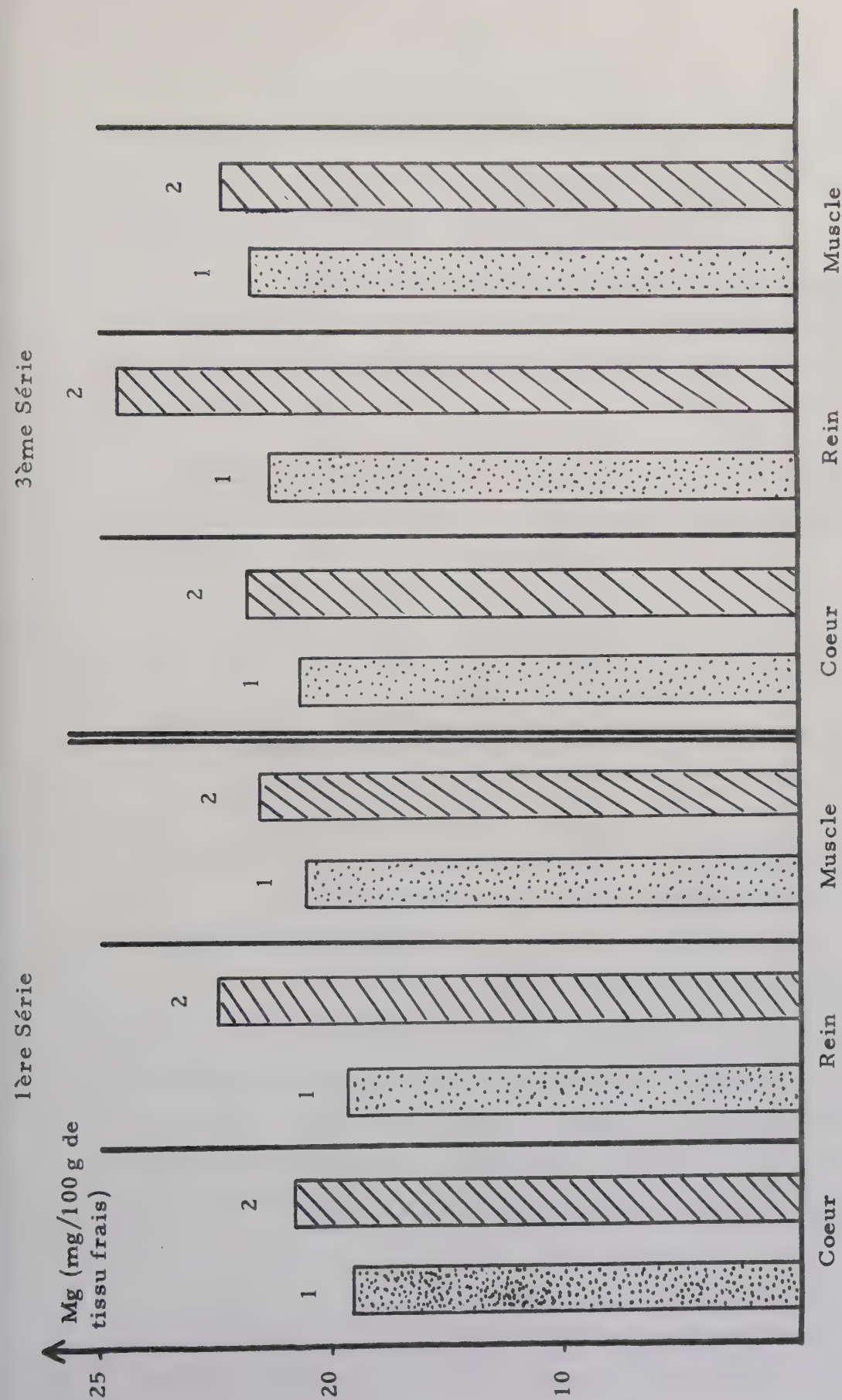


Figure 29

VALEURS MOYENNES DES TENEURS EN MAGNESIUM
DES ORGANES DES LOTS N° 1 (TEMOINS) ET N° 2 (VIT. D)

La comparaison des teneurs en magnésium des organes dans les deux lots montre que celle du lot 2 est supérieure à celle du lot 1 avec la probabilité $(p)^x$ de 0,01 pour le coeur, 0,01 pour le rein. La différence n'est pas significative pour le muscle.

Quant au magnésium plasmatique, il s'abaisse fortement et dans des proportions équivalentes, chez les rats soumis à la seule vitamine D ($p < 0,01$) comme le montre le tableau XIV.

TABLEAU XIV
MOYENNE DES TAUX DE Mg ET DE Ca PLASMATIQUES, Mg
GLOBULAIRE DES ANIMAUX TEMOINS ET DES ANIMAUX SOUMIS A LA
VITAMINE D₃

Lots	Mg plasmatique mg/l	Ca plasmatique mg/l	Mg globulaire mg/l
N° 1 Témoins	21,6	104	46
N°2 vitamine D ₃	14,7	128,7	44,6

On constate, par contre, que le magnésium globulaire des deux lots reste voisin.

2e série : le résultat précédent a été rendu possible grâce à la dose élevée de vitamine D₃. Nous avons vérifié qu'il n'était pas retrouvé avec des doses deux fois moindre (120 000 U de vitamine D₃), cette observation rejoignant celle de GOUNELLE et RAOUL (53) au cours de l'étude de répartition intracellulaire hépatique du calcium et du magnésium chez le Rat soumis à de faibles doses de vitamine D, per os.

3e série : Nous avons confirmé les résultats de la première par une expérimentation plus longue poursuivie pendant

^xprobabilité (p) appréciée selon le test non paramétrique de MANN WHITNEY

trois mois. Les animaux, au nombre de 5, ont reçu chacun 680 000 U de Stérogyl (vitamine D₂).

Les résultats apparaissent identiques à ceux de la première série et montrent (tableau XV et figure 29) :

- une augmentation au niveau du coeur avec une probabilité $p = 0,05$.
- une augmentation du magnésium rénal avec une probabilité $p < 0,01$.
- en revanche, la légère augmentation du Mg musculaire sous vitamine D₂ n'est pas significative.
- nous avons retrouvé la baisse du magnésium plasmatique comme le montrent les valeurs reportées dans le tableau XVI.

TABLEAU XVI

Mg PLASMATIQUE EN mg/l DES TEMOINS ET DES RATS EN
HYPERVITAMINOSE D

Lots	n	M	σ	σ_M
N° 1 Témoins	6	19,4	1,8	0,75
N° 2 vitamine D ₂	5	14,96	1,7	0,78

2 - 2 - 1 - 2 - Teneur en calcium des organes
après surcharge en vitamine D :

1ère série : (chaque Rat a reçu 240 000 U de vitamine D₃). La surcharge calcique n'est pas constante dans le coeur. Certains animaux fixent le calcium, mais plusieurs ont des taux de calcium cardiaque superposables à ceux des témoins. La différence statistique n'est pas significative.

En revanche, la surcharge calcique dans le muscle est nette avec une probabilité de 0,05 ; celle du rein est la plus importante ($p = 0,001$). Les résultats sont consignés dans le tableau XVII et la figure 30.

L'inégalité de surcharge calcique pourrait être expliquée par des variations dans l'administration de vitamine D (les solutions huileuses sont très difficiles à injecter avec rigueur à ces faibles doses). Cette hypothèse est néanmoins peu probable car elle suppose une erreur constante sur les mêmes animaux recevant trois injections par semaine. Plus vraisemblable, apparaît l'inégalité de résorption : chez certains animaux, la solution huileuse de vitamine D reste dans les tissus sous-cutanés (ou épiploïques) et diffuse mal.

2è série : Avec une dose deux fois moindre, seul le rein manifeste une surcharge en calcium, mais ceci dans les limites très larges puisque nous avons trouvé des valeurs ; 34,5 - 81,1 - 40,5 - 202,00 mg/100 g de tissu frais, alors que la moyenne trouvée sur 7 rats était de 16,1 mg/100 g avec $\sigma_M = 11$.

3è série : Les rats recevant des doses élevées de vitamine D₂ montrent une surcharge calcique très importante sur le foie, le coeur, le rein, le muscle (tableau XVIII, figure 30). Mais là encore, la surcharge calcique prédomine quant au rein, elle est faible sur le foie.

TABLEAU XVII

TENEUR EN CALCIUM DES ORGANES (mg/100 g de tissu frais) ET CALCEMIE (mg/l)

DES ANIMAUX TEMOINS ET DES ANIMAUX EN HYPERVITAMINOSE D₃

LOTS	COEUR			REIN			MUSCLE			PLASMA		
	n	M	σ	σ_M	n	M	σ	σ_M	n	M	σ	σ_M
N° 1 Témoins	7	12,06	3,1	1,17	7	13,35	1,8	0,67	6	13,56	4,1	1,71
N° 2 vitamine D ₃	10	47	59,5	18,9	11	90,77	90	29	11	28	13,86	4,2
									9	128,7	7,48	2,47
										97	4,30	1,6

3ème Série

1ère Série

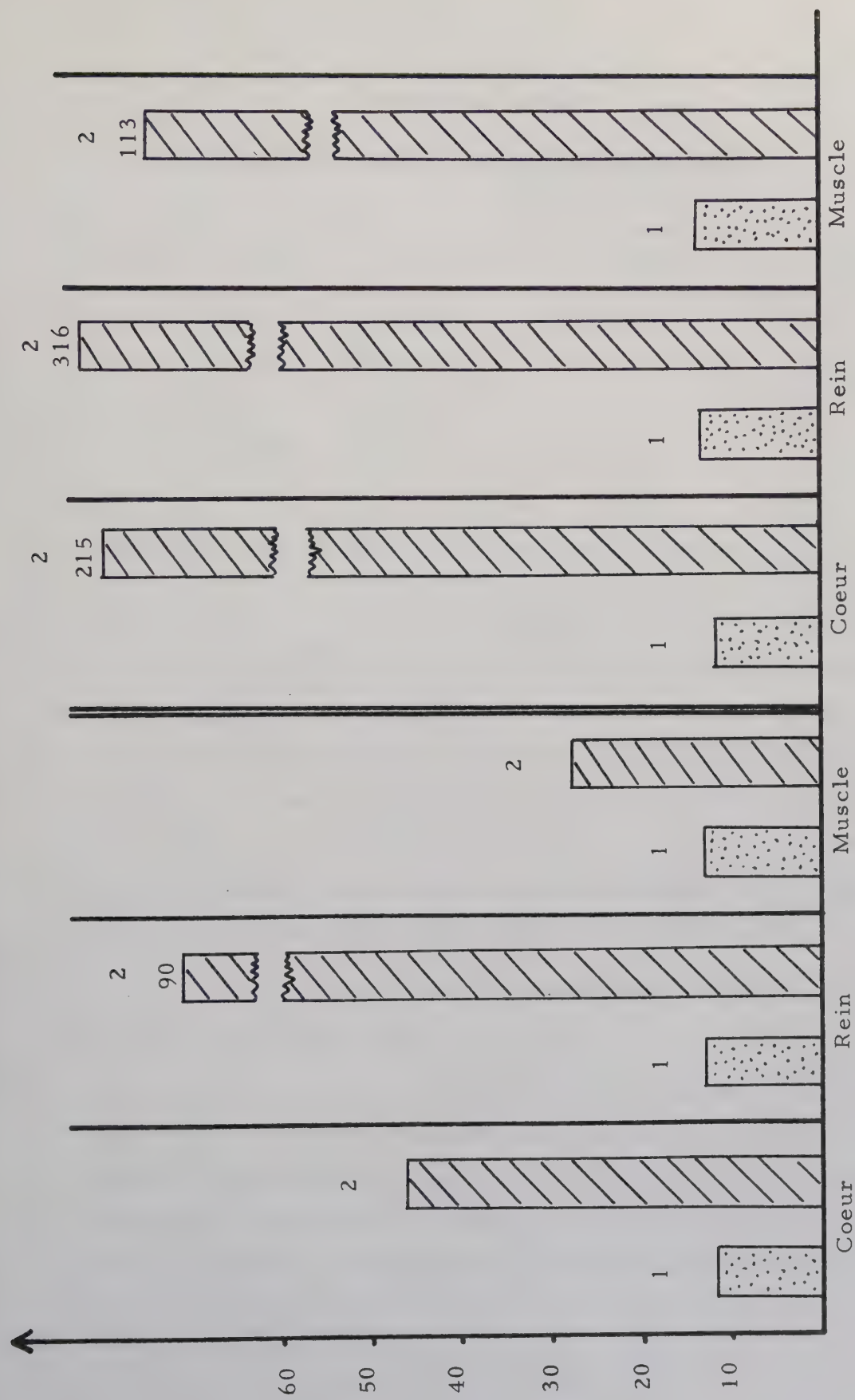


Figure 30

VALEURS MOYENNES DES TENEURS EN CALCIUM
DES ORGANES DES LOTS N° 1 (TEMOINS) ET N° 2 (VIT. D)

TABLEAU XVIII

CALCIUM TISSULAIRE DES ANIMAUX SOUMIS A LA VITAMINE D₂

Lots	FOIE	COEUR	REIN	MUSCLE
1	9,82	385,0	525,0	234,0
2	21,60	294,0	284,2	226,0
3	8,25	59,60	122,5	33,8
4	13,85	171,0	281,0	37,6
5	10,80	190,0	368,0	35,7

2 - 2 - 2 - Radiothyroïdectomie par ¹³¹I

2 - 2 - 2 - 1 - : la radiothyroïdectomie, seule, ne provoque aucune modification de la teneur en magnésium du coeur, du rein, du muscle lombaire. L'expérience réalisée sur 9 animaux fournit une valeur moyenne en magnésium de 21,25 mg/100 g de tissu frais pour le coeur (témoin 21,5 mg), 22,71 mg/100 g pour le rein (témoin 22,83 mg), 23,7 mg/100 g pour le muscle squelettique (témoin 23,52 mg). Les valeurs trouvées sont hautement comparables (tableau XIX).

Pour la magnésémie également, il n'y a pas de différence significative avec les témoins.

La radiothyroïdectomie par ¹³¹I n'a pas déterminé de modification du calcium tissulaire au niveau du coeur et du rein, comme en témoignent les chiffres du tableau XX. Il n'y a aucune différence significative entre les témoins et les animaux traités. Quant au foie et au muscle, les différences de moyennes proviennent de la dispersion de certains chiffres.

TABEAU XIX

Mg TISSULAIRE ET PLASMATIQUE DES TEMOINS ET DES ANIMAUX RADIOTHYROIDECTOMISES

Lots	COEUR				REIN				MUSCLE				PLASMA			
	n	M	σ	σ_M	n	M	σ	σ_M	n	M	σ	σ_M	n	M	σ	σ_M
N° 1 témoins	8	21,5	2,2	0,78	8	22,89	2,4	0,84	8	23,52	5,29	1,86	6	19,4	1,8	0,75
N° 4 ¹³¹ I	9	21,25	1,55	0,51	9	22,71	3,34	1,11	8	23,71	5,1	1,80	9	20,5	2,6	0,88

TABLEAU XX

CALCIUM TISSULAIRE DES TEMOINS ET DES ANIMAUX RADIO-
THYROIDECTOMISES

	FOIE	COEUR	REIN	MUSCLE
Témoins	3,64	9,43	11,28	8,42
Radiothyroïdectomisés	6,58	9,09	11,84	25,31

2 - 2 - 2 - 2 - La radiothyroïdectomie chez les animaux recevant par la suite de la vitamine D dans les mêmes conditions que l'expérience précédente (lot n° 3), supprime non seulement l'augmentation du magnésium cardiaque, rénal et musculaire provoquée par la vitamine D, mais semble pouvoir entraîner une diminution des teneurs en magnésium du coeur et du muscle, jusqu'à rendre ces dernières inférieures aux valeurs correspondantes du lot témoin (tableau XXI et figure 31) (109).

En effet, dans la première série, la comparaison des taux en magnésium des organes montre que :

	COEUR	REIN	MUSCLE
Le Mg des animaux ^{131}I + vitamine D_3 < Mg des té- moins.	$p = 0,03$	d. n. s. ^x	$p = 0,02$
Le Mg des animaux ^{131}I + vitamine D_3 < Mg des ani- maux ayant reçu vitamine D_3	$p = 0,001$	$p = 0,01$	$p = 0,001$

^x d. n. s. = différence non significative

TABEAU XXI

TENEUR EN Mg (COEUR, REIN, MUSCLE, PLASMA) DES TEMOINS ET DES RADIOTHYROÏDEC-

TOMISES RECEVANT DE LA VITAMINE D (1ère et 3ème série)

LOTS	COEUR				REIN				MUSCLE				PLASMA			
	n	M	σ	σ_M	n	M	σ	σ_M	n	M	σ	σ_M	n	M	σ	σ_M
<u>1ère série</u>																
N° 1 Témoins	17	19,29	2,35	0,57	17	19,56	4,15	1,01	17	21,22	4,0	0,97				
N° 3 ¹³¹ I + vit D ₃	12	17,50	1,90	0,56	12	21,23	2,35	0,68	12	19,15	1,45	0,42				
<u>3ème série</u>																
N° 1 Témoins	8	21,50	2,20	0,78	8	22,89	2,4	0,84	8	23,52	5,29	1,86	6	19,4	1,8	0,75
N° 3 ¹³¹ I + vit D ₂	10	20,14	3,03	0,96	10	24,08	6,12	1,93	10	23,06	2,86	0,9	8	19,7	1,7	0,61

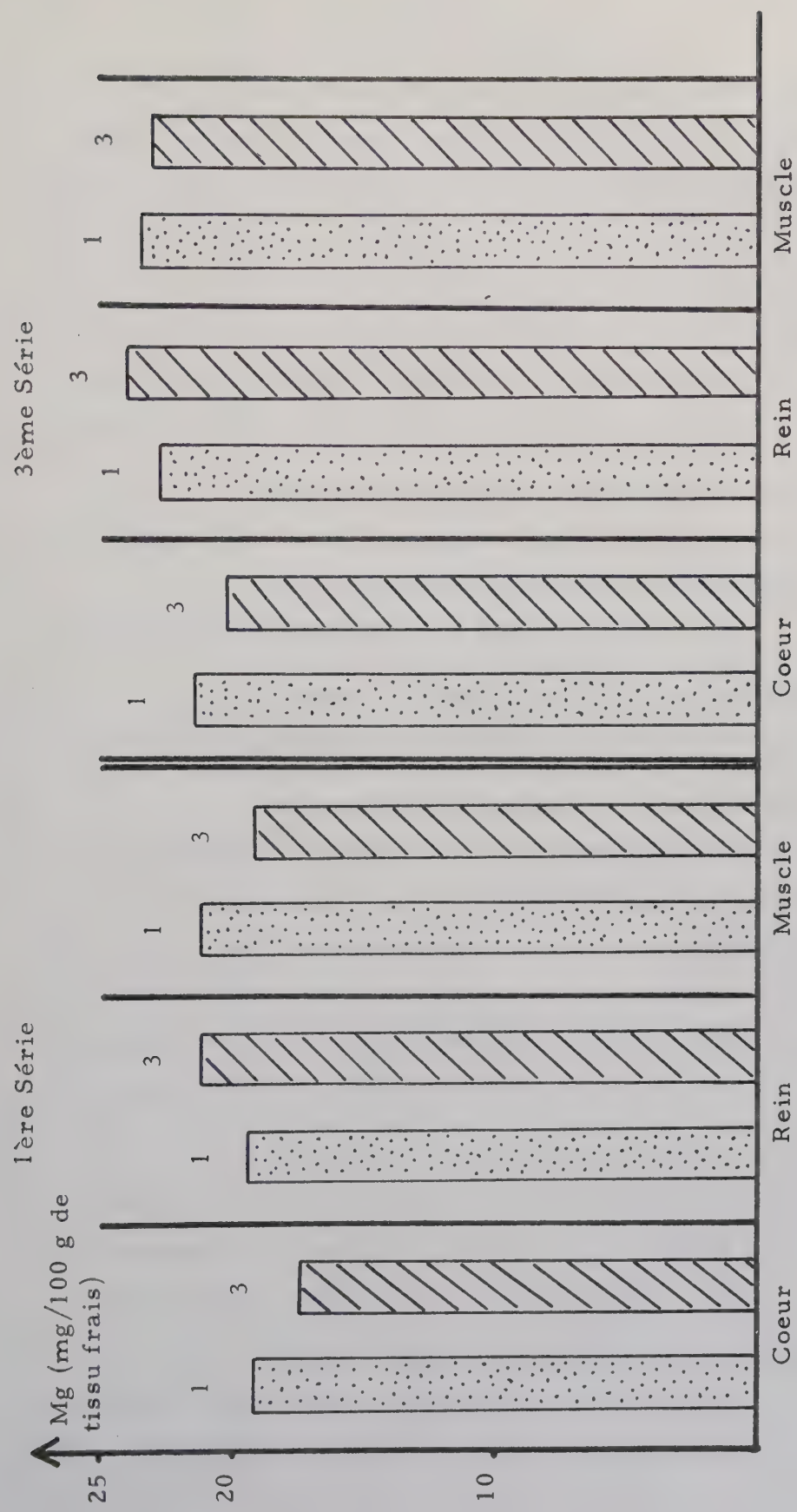


Figure 31

VALEURS MOYENNES DES TENEURS EN MAGNESIUM
DES ORGANES DES LOTS N° 1 (TEMOINS) ET N° 3 (¹³¹I + VIT. D)

Le même phénomène a été retrouvé chez les animaux radiothyroïdectomisés et recevant du Stérogyl (3^e série) à forte dose per os, avec cependant des différences moins significatives entre animaux témoins et animaux radiothyroïdectomisés recevant la vitamine D₂, d'une part, (surtout en ce qui concerne les muscles squelettiques) ; entre animaux radiothyroïdectomisés recevant la vitamine D₂ et animaux à thyroïde intacte soumis au même traitement, d'autre part (lots 2 et 3 de la 3^e série). Dans ce cas, on constate :

- une nette absence d'augmentation du Mg cardiaque (résultat obtenu avec une probabilité de 0,02 - 0,03) ;
- une diminution du Mg rénal, résultat avec pourcentage d'erreur plus important (p = 0,10).

Au niveau du Mg musculaire, le phénomène n'est pas net ; nous n'expliquons pas cette divergence avec les résultats de la 1^{ère} série.

La thyroïde ne semble pas indispensable, dans les conditions physiologiques normales, pour le maintien du taux de Mg tissulaire ; par contre, elle intervient pour induire une surcharge en Mg des tissus dans des conditions anormales telles qu'une forte administration de vitamine D. On peut alors se poser la question : la vitamine D agit-elle directement ou par l'intermédiaire de la thyroïde ? (puisque l'intégrité de la parathyroïde a été contrôlée).

Par contre, la surcharge calcique du coeur devient évidente, et même en ce qui concerne le muscle et le rein, elle est supérieure à celle des animaux intacts ayant reçu la même quantité de vitamine D (tableau XXII et figure 32).

La comparaison des teneurs en calcium dans les différents lots montre que (tableau XXIII) :

TABEAU XXII

TENEUR EN CALCIUM DES ORGANES ET PLASMA DES TEMOINS, DES ANIMAUX SOUS VITA-

MINE D₃ ET DES ANIMAUX RADIOTHYROIDECTOMISES SUBISSANT LE MEME TRAITEMENT

lère SERIE	COEUR			REIN			MUSCLE				PLASMA			
	n	M	σ	σ_M	n	M	σ	σ_M	n	M	σ	σ_M	n	M
1e Témoins	7	12,06	3,1	1,17	7	13,35	1,77	0,67	6	13,56	4,2	171	7	97
2e Vitamine D ₃	10	47	59,5	18,9	11	90,77	96	29	11	28	13,6	4,2	9	128,7
3e ¹³¹ I + Vitamine D ₃	12	86,18	79,5	23	12	168,4	145	42	12	83,8	107	31	13	140

4,30 1,62
7,48 2,5
5,39 1,5

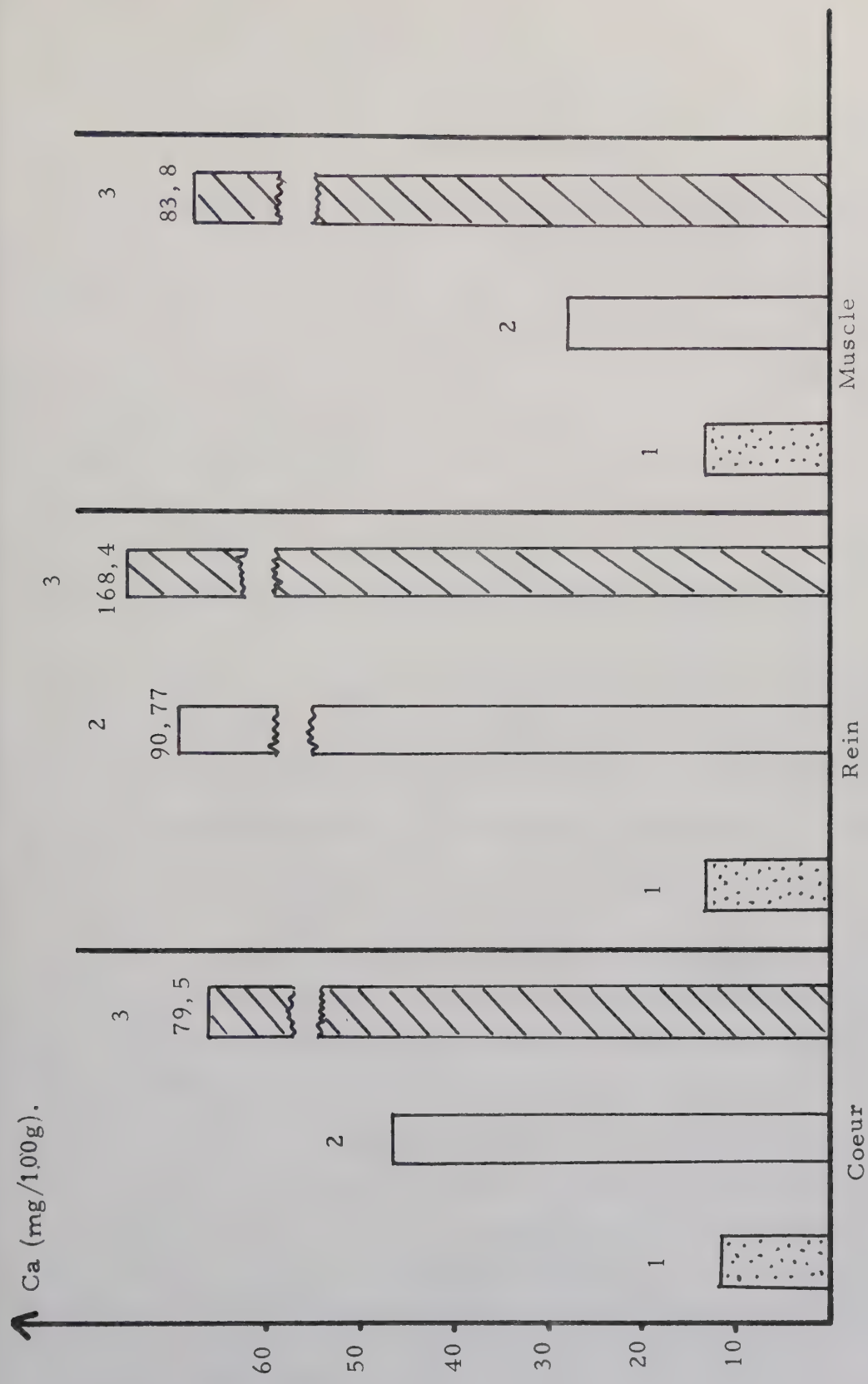


Figure 32

VALEURS MOYENNES DE CALCIUM TISSULAIRE
DES LOTS N° 1 (TEMOINS), N° 2 (VIT. D₃) ET N° 3 (131I + VIT. D₃)
PREMIERE SERIE

TABLEAU XXIII

COMPARAISON DU CALCIUM TISSULAIRE DES LOTS 1, 2, 3

	COEUR	REIN	MUSCLE
Ca lot 2 > Ca lot 1	non significative	p = 0,001	p = 0,05
Ca lot 3 > Ca lot 1	p = 0,0001	p = 0,0001	p = 0,02
Ca lot 3 > Ca lot 2	non significative	p = 0,06	p = 0,05

La calcémie des rats thyroïdectomisés à parathyroïdes intactes et recevant de la vitamine D (lot 3) est nettement plus élevée que celle des animaux des autres lots (tableau XXII). La valeur significative de ces différences a été vérifiée statistiquement pour $p < 0,01$.

Ce phénomène est en faveur du rôle de la thyroïde dans la protection contre la surcharge calcique tissulaire ; mais on ne peut dire si cette action est directe ou secondaire à celle de la thyroïde sur la calcémie.

L'existence d'une hypercalcémie nettement plus importante chez les rats radiothyroïdectomisés à parathyroïdes intactes confirme la sécrétion d'un principe hypocalcémiant par la thyroïde. La radiothyroïdectomie détruisant totalement le parenchyme thyroïdien sans léser les parathyroïdes (20), permet de vérifier que ces dernières sont incapables, du moins à elles seules, de réduire l'hypercalcémie. L'aspect histologique de repos des parathyroïdes des animaux radiothyroïdectomisés et recevant de la vitamine D est comparable à celui de tous les animaux soumis à la

seule vitamine D.

Cette substance secrétée par la thyroïde semble avoir aussi un effet hypomagnésémiant, puisque le taux normal de Mg plasmatique est maintenu en l'absence de thyroïde alors qu'on a une nette hypomagnésémie chez les animaux recevant uniquement de la vitamine D. Puisque le Mg tissulaire des animaux radiothyroïdectomisés et soumis à la vitamine D n'est pas augmenté par rapport aux lots 2 et 1, on peut penser qu'en l'absence de cette substance, le transfert du Mg vers les tissus, est inhibé.

Dans la deuxième série, où la dose de vitamine D est moitié moindre, l'effet de la radiothyroïdectomie est particulièrement net sur le calcium du tissu rénal, alors qu'aucune surcharge n'est retrouvée chez les animaux intacts soumis à la seule vitamine D₃. Cependant, le dosage du Ca musculaire ne montre pas de modification notable.

Ces résultats ont été confirmés par l'expérience effectuée avec le Stérogyl, administré par voie orale à forte dose chez les animaux radiothyroïdectomisés.

2 - 2 - 3 - Effet de la thyroxine :

2 - 2 - 3 - 1 - Magnésium : Les rats ayant reçu une injection sous cutanée quotidienne de 0,5 mg de thyroxine, pendant les 8 jours qui précèdent le sacrifice (lot n° 5), montrent un enrichissement en magnésium du coeur et du muscle (probabilité 0,01). Par contre, le rein ne paraît pas influencé dans les mêmes conditions (109).

L'association de thyroxine à la vitamine D (lot 4) élève la teneur en Mg des trois organes. Mais, comparée aux résultats obtenus avec la vitamine D seule, cette augmentation reste, pour le coeur et le rein, faible et non significative. Par contre, l'association des effets de la thyroxine et de ceux de la vitamine D rend significatif l'enrichissement

en magnésium du muscle par rapport au taux constaté chez les témoins non traités. Tous les résultats sont reportés dans le tableau XXIV.

La thyroxine agit au niveau de l'anté-hypophyse, et par un phénomène de "feed-back", met au repos les cellules principales de la thyroïde.

En revanche, le blocage de la sécrétion endogène par le Basdène (benzyl thiouracile = BTU) aux doses où nous l'avons employé (5 mg par jour durant les 7 jours qui précèdent le sacrifice) n'a en rien modifié la surcharge magnésienne due à la vitamine D. La comparaison des chiffres trouvés pour les lots 2 et 6 montre une grande analogie des teneurs en Mg au niveau des trois organes. L'efficacité du traitement par le BTU sur la thyroïde a été prouvée histologiquement : aspect hyperactif des cellules principales, à gros noyaux vésiculeux et nucléolés, avec quelques figures de mitose surtout après blocage à la colchicine 4 heures avant le sacrifice : "état d'hyperactivité à vide" comme l'appellent les histologistes.

Les différences observées entre le lot ayant subi une radio-thyroïdectomie complète et le lot ayant reçu du BTU en même temps que la vitamine D montrent que l'action des sécrétions thyroïdiennes sur le métabolisme du Mg ne peut être attribuée à la thyroxine seule.

2 - 2 - 3 - 2 - Calcium : La thyroxine ne semble avoir aucune influence sur la teneur en calcium du coeur, du rein, du muscle :

- seule, elle ne provoque aucune modification par rapport aux animaux témoins (lots 1 et 5).

- en association avec la vitamine D₃, nous n'avons observé aucune différence significative avec les animaux recevant uniquement de la vitamine D₃ (lots 2 et 4), comme en témoignent les

TABEAU XXIV

MAGNESIUM TISSULAIRE (COEUR, REIN, MUSCLE) CHEZ LES RATS AYANT SUBI DIFFERENTS

TRAITEMENTS

Lots n°	COEUR				REIN				MUSCLE			
	n	M	σ	σ_M	n	M	σ	σ_M	n	M	σ	σ_M
1 - Témoins	17	19,29	2,35	0,57	17	19,56	4,15	1,01	17	21,22	4,0	0,97
2 - Vitamine D ₃	10	21,49	2,02	0,64	11	25,00	2,6	0,79	11	23,18	3,45	1,04
3 - Vitamine D ₃ + T4	7	24,90	9,2	3,37	9	25,39	2,7	0,90	9	25,72	3,7	1,24
5 - Thyroxine T4	9	21,70	2,38	0,76	9	19,97	1,2	0,40	9	26,47	3,69	1,23
6 - Vitamine D ₃ + BTU	9	20,98	3,03	1,01	10	25,00	3,32	1,05	9	23,47	4,95	1,65

TABLEAU XXV

TENEUR EN CALCIUM DES ORGANES (COEUR, REIN, MUSCLE) ET DU PLASMA DES LOTS

1, 2, 4, 5 et 6.

Lots n°	COEUR			REIN			MUSCLE				PLASMA			
	n	M	σ	σ_M	n	M	σ	σ_M	n	M	σ	σ_M	n	M
1 - Témoins	7	12,06	3,1	1,17	7	13,35	1,8	0,67	6	13,56	4,1	1,71	7	97
2 - Vitamine D ₃	10	47	59,5	18,9	11	90,77	90	29	11	28	13,8	4,2	9	128,7
4 - Vitamine D ₃ + T4	7	36,5	62	23,5	9	95,2	123	41	9	24,7	22,2	7,4	10	127,4
5 - T4	9	12,9	6,3	2,1	9	17,4	7,5	2,5	9	13,84	4,5	1,5		
6 - BTU + Vitamine D ₃													8	128,4
														7,62
														2,69

valeurs du tableau XXV

L'élévation de la calcémie est de degré équivalent dans les lots 2, 4 et 6 qui ont conservé leur glande thyroïde, que celle-ci soit intacte (lot n° 2), que son activité thyroxino-sécrétante soit mise au repos par l'apport de thyroxine (lot n° 4) ou bloquée par le BTU (lot n° 6).

La comparaison des teneurs en calcium des différents lots donne les résultats du tableau XXVI.

TABLEAU XXVI

COMPARAISON DES TENEURS EN CALCIUM DES ORGANES ET DU PLASMA DES DIFFERENTS LOTS (n. s. = non significative).

	COEUR	REIN	MUSCLE	PLASMA
Lot 2 lot 1	n. s.	p = 0,001	p = 0,05	p = 0,01
Lot 2 et lot 4	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Lots 1 et 5	n. s.	n. s.	n. s.	
Lots 2 et 6				n. s.
Lots 4 et 6				n. s.

Cependant, la courte durée d'administration de la thyroxine (8 jours) par rapport à celle de la vitamine D₃ (60 jours) ne permet pas de tirer une conclusion définitive, la surcharge ayant probablement précédé l'administration de thyroxine.

2 - 3 - Discussion :

Nous observons, après administration de vitamine D aux rats, une surcharge en magnésium statistiquement significative du coeur,

du rein, du muscle, que la thyroïde soit intacte anatomiquement et physiologiquement, ou que, intacte anatomiquement, elle voie sa sécrétion endogène bloquée par le BTU ou mise au repos par injection de thyroxine.

En revanche, la suppression par ^{131}I de la totalité de la glande thyroïde, les parathyroïdes étant respectées, entraîne la suppression de l'enrichissement en Mg par la vitamine D des organes précédents.

Il n'est pas facile d'expliquer ce phénomène. Notons seulement que les cellules "C" considérées comme sécrétantes de thyrocalcitonine (20), sont intactes et actives chez les animaux soumis respectivement à la vitamine D, à la vitamine D + thyroxine, à la vitamine D + BTU, (cellules "C" hypertrophiées, arrondies ; à gros noyau vésiculeux, clair et nucléolé ; en mitose dans le cas de BTU), alors qu'elles sont détruites par la radiothyroïdectomie (lot 3).

Deux facteurs peuvent concourir à la chute de la magnésémie chez les animaux à thyroïde intacte soumis à la vitamine D : le passage du Mg vers les tissus et la perte urinaire.

Le rôle de la thyrocalcitonine dans le métabolisme du magnésium est très discuté : nul pour certains (9)(79), pour d'autres, elle empêcherait la libération du Mg osseux (120). En accord avec ces derniers, nous pouvons penser que l'éventuelle compensation par soustraction du Mg à l'os, de l'hypomagnésémie induite par la vitamine D, est inhibée par l'hypersecrétion de thyrocalcitonine déclenchée par l'hypercalcémie vitaminique.

L'absence de chute de la magnésémie chez les animaux radiothyroïdectomisés et recevant de la vitamine D peut s'expliquer par le fait qu'il n'y a pas de passage de Mg vers les tissus ; seule subsiste la perte urinaire dont l'importance est discutée et même dénoncée comme respon-

sable de l'hypomagnésémie (120). En tout cas, cette hypomagnésémie peut être compensée par décharge osseuse de Mg ; en effet, la thyrocalcitonine n'est plus sécrétée, la radiothyroïdectomie ayant détruit à la fois les cellules claires et les cellules principales, comme chez les animaux soumis au même traitement vitaminique mais à thyroïde intacte .

Cette constatation pourrait être portée au crédit de l'intervention de la thyrocalcitonine dans le métabolisme du magnésium.

2 - 4 - Conclusion :

- l'accumulation de magnésium, que nous avons constatée dans le coeur, le rein et à un degré moindre dans le muscle squelettique dans l'hypervitaminose D, prouve que l'effet rapporté par certains auteurs ne concerne pas uniquement l'os, le foie et le pancréas. Il semble donc que la chute importante de la magnésémie résultant d'un traitement vitaminique mérite d'être considérée comme l'expression, non seulement de déperditions urinaires, mais aussi, sans doute, d'accumulation de magnésium dans les tissus.

- les résultats de l'administration simultanée de vitamine D et de thyroxine, sur la teneur en magnésium, en particulier du muscle squelettique, pourraient plaider en faveur de mécanismes d'action différents de ces deux substances ou plutôt de l'inhibition par le fait de la thyroxine d'une substance d'origine thyroïdienne type calcitonine. D'ailleurs, la suppression des effets de la vitamine D par la radiothyroïdectomie est en faveur d'une telle hypothèse et souligne l'importance de l'intervention de la thyroïde dans le rôle joué par la vitamine D vis-à-vis des mouvements du magnésium (les parathyroïdes étant intactes dans tous les cas).

Chez les rats radiothyroïdectomisés, les taux de magnésium musculaire et cardiaque étaient même inférieurs à ceux des témoins ; observation qui rend compte, dans le maintien des échanges cellulaires du

magnésium, de l'action de la thyroïde grâce à la thyroxine et à la thyrocalcitonine.

- l'hypercalcémie chronique entraînée par une surcharge en vitamine D est plus importante chez les rats qui ont subi une radiothyroïdectomie totale par ^{131}I , détruisant à la fois les cellules principales et les cellules claires et laissant les parathyroïdes intactes, que chez les témoins soumis au même traitement vitaminique. Par ailleurs, les figures d'hypertrophie observées au niveau des cellules claires sont en accord avec le rôle de la thyrocalcitonine, sécrétée par ces cellules, chez les animaux à thyroïde intacte ou bloquée par la thyroxine ou le BTU, sur les mouvements du Ca et du Mg dans l'organisme.

- les faibles répercussions, sur la répartition du Ca et du Mg, du traitement des animaux à la thyroxine ou au BTU en même temps qu'à la vitamine D, semblent mettre au second plan la participation des cellules principales thyroïdiennes à la régulation du métabolisme du calcium et du magnésium.

TROISIEME CHAPITRE

ETUDE DE LA CARENCE EN MAGNESIUM

I - ETUDES EXPERIMENTALES

De nombreux auteurs ont étudié les effets d'une carence en magnésium chez l'animal, depuis les constatations importantes de LEROY en 1926 (89), puis de KRUSE, ORENT et Mc COLLUM en 1932, démontrant qu'un apport de magnésium est indispensable à la croissance et à la vie (83).

En 1937, WATCHORN et Mc LANCE ont étudié les effets de la déficience magnésique chez le Rat avec des régimes permettant une croissance presque normale ; ils insistent sur l'importance des troubles trophiques des téguments et des phanères (180). Ces modifications rappellent celles observées au cours de l'avitaminose B₂. La réaction diffère un peu chez l'adulte, le même régime conduit à une perte de poids.

KRUSE et Coll. nourrissent des rats nouveau-nés avec un régime ne contenant que 0,18 mg de magnésium pour 100 g de nourriture. Au bout de 3 à 4 jours, ils observent une hyperémie cutanée qui dure 10 à 12 jours. Période qui correspond pour RICHET à une forte décharge de corticostérone (9^e jour), alors l'érythème commence à disparaître (135). Vers le 18^e jour, l'animal devient très irritable, en proie à des tressaillements musculaires, puis à des convulsions qui précèdent, en règle générale, de peu la mort. Les animaux qui survivent développent des troubles trophiques des téguments et des phanères ; la peau est infiltrée, les poils tombent, les ongles deviennent cassants. La mort survient avant qu'il n'y ait une chute nette du poids.

En 1938, TUFT et GREENBERG (166) reprennent, confirment et complètent les travaux antérieurs sur le Rat en utilisant un régime moins carencé (1 - 2 mg/100 g d'aliment) qui permet une période d'obser-

vation plus longue. Ils ont distingué deux phases dans la carence expérimentale : la première comportant des phénomènes d'hyperexcitabilité, d'hyperémie et de vasodilatation, qui s'effacent durant la deuxième période derrière les troubles nutritionnels conduisant à la cachexie et à la mort. Le déficit de croissance s'accroît au fur et à mesure que la carence magnésique continue. Des lésions anatomiques du rein sont observées au stade final.

La restauration du magnésium dans le régime permet une reprise de croissance ; la nature du sel de magnésium introduit par voie digestive, semble importante vis-à-vis de la rapidité d'absorption ; les manifestations cutanées disparaissent dans un deuxième temps.

Les mêmes auteurs ont étudié le phénomène de la carence chez les rates gravides ; à la naissance, les petits sont de poids normal mais développent très vite les signes de déficience : hyperexcitabilité et vasodilatation cutanée. Leur magnésium total n'augmente pas comme celui des sujets nourris par des mères dont le régime est normal. Ce syndrome se développe durant la période d'allaitement ; donc le lait maternel est déficient en magnésium et l'organisme ne peut mobiliser le magnésium des autres tissus au-delà d'un certain taux en cas de carence.

Beaucoup de divergences furent rapportées par la littérature quant à la durée et la sévérité des symptômes ; elles sont le reflet de différence de besoins en magnésium, et des teneurs variables en calcium, potassium, phosphore et protéines des régimes alimentaires

La carence chez un Rat adulte conduit à une perte de poids, tandis que la croissance du fémur continue jusqu'au 46^e jour, puis s'arrête. Donc, le déclin du poids de la fraction non squelettique de l'animal est plus important que celui du corps entier (104).

Des souriceaux en sevrage avec régime carencé en magnésium représentent les mêmes signes cliniques que les rats en croissance, sauf l'hyperémie des oreilles : extrême agitation, mouvements brusques non orientés, puis rigidité, enfin convulsions alternant avec période de prostration et d'inactivité (43).

Si on soumet des chiens au régime sans magnésium, l'amaigrissement et les troubles trophiques apparaissent plus nettement ; les phénomènes d'hyperexcitabilité sont d'autant plus nets que l'animal est plus jeune (182).

Dans la "tétanie d'herbage" des bovins, qui se manifeste au printemps, lors des premières semaines où les vaches sont menées au pâturage (156) (161), l'animal apparaît instable, agité ; sa démarche est incertaine, il ne mange plus, tandis que surviennent des mouvements musculaires, des grincements de dents et des roulements d'yeux, donnant à l'animal un air inquiet et sauvage. Enfin, apparaissent les convulsions toniques et cloniques suivies de paralysie et de coma. La calcémie et la magnésémie sont basses, l'abaissement portant plus nettement sur le calcium que sur le magnésium. La phosphorémie est normale. L'injection intraveineuse d'un mélange de chlorure de calcium et de chlorure de magnésium amène une rapide amélioration, mais l'animal reste nerveux et sans appétit pendant plusieurs jours. En l'absence de ce traitement, l'animal meurt. L'analyse chimique des fourrages avec lesquels les animaux avaient été nourris l'hiver, les montre pauvres en calcium, mais riches en phosphore, tandis que l'herbe de printemps est riche en azote et en potassium. La teneur en magnésium est variable, basse dans certains cas, normale dans d'autres. Seuls, les troupeaux qui pâturent dans des prés fertilisés avec des azotes inorganiques, comme le sulfate d'ammonium, sont affectés. Le contenu de la panse des vaches malades est très riche en ammonium. On a

pu reproduire expérimentalement la maladie en nourrissant un animal avec un régime enrichi en carbonate d'ammonium. Dans ces conditions, les sels magnésiens alimentaires se trouvant en un milieu alcalin où prédominent ammonium et phosphates, sont insolubles et inabsorbables par l'intestin. Il semble, en outre, que l'animal soit incapable de compenser la diminution de l'apport magnésien en prélevant cet élément sur ses réserves osseuses. En effet, le magnésium osseux n'est pas diminué, comme on l'observe dans les autres syndromes de déficience magnésique.

2 - MODIFICATIONS BIOLOGIQUES

La manifestation biologique la plus précoce et la plus fidèle dans la carence en magnésium est l'abaissement du taux de magnésium sanguin aussi bien plasmatique que globulaire. Le magnésium plasmatique s'abaisse jusqu'à 10 mg/l et moins (112) (104) (158) (167). La chute porte également sur le magnésium total et le magnésium ultrafiltrable. Cet abaissement du magnésium plasmatique et globulaire a été également décrit chez l'homme nourri avec un régime artificiel dépourvu de magnésium (153). La magnésurie s'abaisse très précocement, avant que la magnésémie ne se modifie (158). Ce qui indique la mise en jeu rapide, principalement au niveau du rein, d'un mécanisme de conservation du magnésium.

MARTINDALE observe 5 minutes après, une crise convulsive chez le Rat, une augmentation du magnésium et du phosphore plasmatiques. Quatre heures plus tard, ceux-ci reviennent à leur taux initial. Il attribue cette augmentation, ainsi que celle qui survient après la mort par carence, à une décharge à partir de l'os (104). La constance de la densité du plasma élimine l'hypothèse d'une hémococoncentration et la fixité du taux de potassium plasmatique permet d'écarter l'éventualité d'une diffusion des cations à partir d'espaces cellulaires. ORENT, KRUSE et Mc COLLUM (83)

ont trouvé que l'augmentation du magnésium sérique s'accompagnait d'une diminution du magnésium osseux.

La plupart des auteurs ont observé une très faible modification de la concentration en magnésium des tissus mous. La chute du magnésium osseux est de règle chez des rats en croissance, soumis à un régime carencé en magnésium. Jerry CHUTKON (72) a étudié l'absorption, l'excrétion et la distribution tissulaire chez ces animaux déficients avec du ^{28}Mg : après administration intra-péritonéale, il remarque une excrétion urinaire négligeable, fixation rapide sur le squelette, le rein, le coeur, le foie, plus latente sur les muscles, les testicules et le cerveau. Seul, l'os des témoins a une teneur en ^{28}Mg supérieure à celui des carencés. L'administration ultérieure du magnésium non marqué, fait disparaître la radioactivité de l'os. Le magnésium échangeable de la carapace hydratée de l'hydroxyapatite de l'os chez le jeune Rat normal, se trouve sous deux formes, différent par leur "turnover". Ceci est vrai aussi pour certains organes à activité enzymatique élevée : coeur, rein, peut être le foie. La relative stabilité de la concentration en ^{28}Mg dans le muscle squelettique, le cerveau, les testicules, suggère que ces tissus manquent de la phase la plus labile. La fraction squelettique la plus labile et la faible teneur en ^{28}Mg , d'excrétion pourtant importante, indiquent qu'elle est mobilisée vers le liquide extracellulaire et les tissus mous à turnover bas (72).

La réserve labile de l'os diminue avec l'âge puisqu'elle est estimée à 30 % chez le Rat en croissance et à 17 % chez le Rat adulte par MARTINDALE (104).

CUNNINGHAM n'observe aucune modification du magnésium du squelette de Veau adulte carencé ; néanmoins, Mc INTYRE et DAVIDSON signalent une diminution modérée du magnésium du muscle squelettique du Rat adulte carencé.

Pour MARTINDALE, il y a une chute significative du taux de magnésium (8,4 - 13,0 %) dans le foie, le coeur, la cuisse, le rein et le cerveau, et la diminution du poids de la carcasse non squelettique accentue encore la valeur absolue de la perte. Le magnésium total hépatique augmente rapidement d'abord, puis diminue continuellement, alors que pour le coeur et le rein, le taux se stabilise (104).

Le magnésium du liquide céphalo-rachidien reste normal pendant les premiers jours de la carence puis les troubles neurologiques, en particulier les convulsions, apparaissent à une date qui coïncide avec celle d'une chute du Mg du L. C. R., du Mg total et du Mg intra-cellulaire du cerveau déterminé par calcul. Le taux de cet élément du L. C. R. se normalise très vite, une heure après administration parentérale du Mg (73).

Le L. C. R. de deux sujets hypomagnésiques avec encéphalopathie métabolique, présente une chute de magnésium, tandis qu'un autre hypomagnésémique sans signe neurologique ne montre pas de modification du Mg du L. C. R. (73).

Chez le Lapin, en cas d'hypomagnésémie provoquée, on n'observe pas certains signes cliniques, tels l'hyperrétractilité neuromusculaire et les convulsions manifestées chez le Rat dans les mêmes conditions. Comme on pouvait le soupçonner, le L. C. R. du Lapin conserve une constance de concentration en Mg, malgré les variations plasmatiques (77).

Ces travaux montrent que la chute de la concentration des milieux extra-cellulaires, n'est pas en rapport avec les valeurs tissulaires. Les liaisons du magnésium intra-cellulaire empêchent l'échange immédiat avec les milieux extra-cellulaires (18). Le maintien et la croissance des tissus mous semblent nécessiter une concentration intracellulaire en ma-

gnésium approximativement normale.

La calcémie est, chez le Rat, en règle générale, augmentée (104) (158) (101) (184) (112), plus rarement normale (81) (152). Chez le Chien, elle est normale (171) ou abaissée (21). Elle est basse dans la tétanie d'herbage et la carence en magnésium chez le Veau. SCHILS (153) retrouve aussi une hypocalcémie en dehors de tout trouble d'absorption intestinale chez deux hommes nourris avec un régime carencé en magnésium, mais contenant un taux normal de calcium.

Les modifications du métabolisme du calcium, de la kaliémie, de la phosphorémie et de la phosphaturie, seront discutées plus loin.

La natrémie et la glycémie restent normales. Au bout de 2 à 3 semaines de carence chez le Rat, on observe une diminution du pouvoir de concentration de l'urine et du pouvoir d'acidification.

L'azotémie, normale au début, s'élève parallèlement au développement de la néphrocalcinose (184). En même temps, apparaît une protéinurie qui peut devenir très importante et s'accompagner d'un véritable syndrome néphrotique, avec oligurie et hypoprotidémie.

Le cholestérol sanguin s'élève surtout dans sa fraction estérifiée. La protéinurie, normale chez le Chien, est abaissée chez le Rat (84).

Chez le Rat, le calcium total du corps, augmente dès la première phase du syndrome de déficience magnésique (166). L'os est anormalement lourd et riche en cendres à cause d'un dépôt excessif de calcium lors de la première phase de la carence expérimentale. Par la suite, la courbe de l'enrichissement calcique de l'os reste parallèle à celle observée chez les animaux témoins. Au total, le calcium total de jeunes rats carencés, augmente d'environ 30 % par rapport à la normale, mais

ce chiffre est trompeur, comme d'ailleurs dans le cas de chute de Mg, dans les tissus mous, car l'amaigrissement dû à la dénutrition augmente le rapport : poids du squelette/poids total. En valeur absolue, le calcium total du Rat carencé, demeure à un taux inférieur à celui de l'animal témoin.

3 - LESIONS HISTOLOGIQUES PROVOQUEES PAR LA CARENCE EN MAGNESIUM:

L'appareil cardio-vasculaire et les reins semblent tout spécialement touchés au cours de la carence en magnésium.

3 - 1 - Lésions cardio-vasculaires :

Elles ont été étudiées chez le Rat (65) (81) (95), le Veau (14) (114), le Chien (171) (182) et la Souris (43).

Quatre types de réactions ont été décrites par les auteurs : infiltration par des cellules inflammatoires, hyperplasie du tissu interstitiel avec réaction fibroblastique, nécroses parcellaires, calcifications (rares pour FARNELL en cas de simple carence en magnésium).

Ces lésions prédominent dans les tissus mésenchymateux périvasculaires, l'intima et la média de l'aorte des gros vaisseaux artérioveineux, l'endocarde et la région profonde du myocarde. Le réseau artériel coronarien est souvent atteint à tous ces niveaux (171) (182).

VITALE et Coll. ont noté chez le Rat et le Singe carencés en magnésium une infiltration par des cellules graisseuses de la région sous intimale de la média de l'aorte, ainsi qu'une fragmentation des fibres élastiques, tandis qu'apparaissent à ce niveau des plaques de tissu fibreux. On a signalé également des zones de dégénérescence des fibres cardiaques et des hémorragies intramyocardiques (81) (14).

C'est la microscopie électronique, mieux que la microscopie optique, qui permet une étude plus précoce et plus fine des altérations

provoquées par la carence, telles : gonflement et vacuolisation des sarcosomes, même dans les régions où les lésions ne sont pas encore visibles au microscope optique. Sur et entre les crêtes des mitochondries, apparaissent des particules à forte opacité électronique qui sont vraisemblablement des amas calciques. Ces derniers peuvent remplir la totalité du sarcosome. Certaines myofibrilles perdent leurs striations, les disques Z et les lignes M se décalent et se rompent. Finalement, les myofibrilles disparaissent par endroits où viennent s'accumuler les composants du réticulum sarcoplasmique, des particules de glycogène et des amas de sarcosomes normaux ou altérés.

L'effet de la carence magnésienne sur la fonction mitochondriale, autrement dit sur la phosphorylation oxydative, sera relaté plus loin.

Les lésions décrites se retrouvent en cas de carence potassique, à cette différence que les sarcoplasmes examinés au microscope électronique ne présentent aucune altération.

3 - 2 - Lésions rénales :

Initialement, elles consistent en un processus inflammatoire avec infiltration lymphocytaire. Secondairement, apparaît une réaction fibreuse et des foyers localisés de nécrose. Elles furent étudiées sur le Rat (61) (67) (82) (95) (149) (181) et la Souris (43).

Le tube rénal est le siège de deux types d'anomalies : des altérations épithéliales dans le cortex et des dépôts calciques visibles à la jonction cortico-médullaire et dans la couche interne de la zone externe de la médulla. La dégénérescence épithéliale semble prédominer dans la première portion du tube contourné proximal, tandis que les précipitations calciques se forment dans la deuxième portion et dans la partie large de la branche ascendante de l'anse de Henlé. A un stade avancé, les obstruc-

tions calculeuses peuvent être responsables d'hydronéphroses.

Les examens au microscope électronique ont montré l'existence, à l'intérieur des lysosomes ou libres dans le cytoplasme de cellules tubulaires, de dépôts denses qui sont probablement des sels de calcium. Ces formations ne sont jamais observées en l'absence de calcifications dans la lumière du tube. Il est donc probable qu'elles sont secondaires à ces dernières.

La constitution de dépôts calciques est en rapport étroit avec la déficience en magnésium. Lorsqu'on corrige celle-ci, les calcifications cessent de se développer. Une carence calcique surajoutée ne les empêche pas d'apparaître ; elles sont cependant moins importantes que si la carence magnésique est isolée.

Contrastant avec l'atteinte intersticielle et tubulaire, les glomérules sont peu touchés. Cependant, on a parfois noté une réaction fibreuse de la capsule de Bowmann et une prolifération endothéliale du capillaire glomérulaire avec quelques dépôts calcaires dans l'espace sous-capsulaire.

3 - 3 - Durée de vie des érythrocytes :

Au Congrès de l'Association Française pour l'Avancement des Sciences (Besançon 1969), Monsieur Pierre LARVOR (de la Station de Physiopathologie de la Nutrition de Theix par St Genès Chamanelle), a fait la communication suivante concernant la durée de vie des érythrocytes chez le Rat, au cours de la carence en magnésium :

40 rats Wistar, âgés de 4 mois au début de l'expérience et pesant en moyenne 270 g ont été répartis en deux lots de 20 dont l'un reçut à volonté une ration semi-synthétique pauvre en Mg (3 mg/100 g d'aliment) et l'autre la même ration complémentée en Mg (150 mg/100g).

Simultanément, il a marqué au ^{51}Cr , les hématies de chacun des animaux et prélevé du sang chaque semaine pour déterminer le Mg sanguin et la radioactivité résiduelle des hématies. Au bout de 3 semaines, les animaux étaient sacrifiés, leur rate pesée. Outre les symptômes classiques de la carence, il a constaté :

- une hypertrophie significative de la rate chez les carencés ;
- un raccourcissement significatif de la durée de vie des globules rouges.

Ces résultats permettent de conclure à une augmentation du rythme de destruction globulaire chez les animaux carencés en magnésium.

3 - 4 - Action du magnésium au niveau des mitochondries :

Les mitochondries sont le siège d'un système qui, couplé aux phénomènes de respiration, permet la phosphorylation d'un certain nombre de corps dont les nucléotides adényliques (ADP - ATP) sont les plus courants. L'ensemble est résumé par le terme "d'oxydation phosphorylante" ou "phosphorylation oxydative". Le magnésium est nécessaire au fonctionnement de ce système et la phosphorylation oxydative est perturbée dans les mitochondries cardiaques isolées de rats déficients en magnésium. Mais on ne sait pas si l'altération de la phosphorylation oxydative est directement en rapport avec la carence ou si elle est secondaire aux altérations morphologiques des sarcosomes privés de magnésium. Une troisième hypothèse suggère que la carence magnésique intervient aux deux endroits. On a montré que les sels de Mg avaient un effet protecteur contre certains types de nécroses cardiaques expérimentales, et il a été suggéré que cette protection dépendait de la correction par le Mg de défauts métaboliques en rapport avec une altération de la phosphorylation oxydative.

La carence en potassium produit des altérations du myocarde

semblables à celles produites par le Mg, avec calcification, nécrose et réaction fibroblastique. Mais au microscope électronique, on n'observe pas les modifications du sarcoplasme vues dans la carence en magnésium.

De l'ensemble des nombreux résultats rapportés dans la littérature, il ressort que la carence expérimentale en magnésium pose encore aux physiologistes et aux biologistes de nombreux problèmes résultant de la complexité des phénomènes induits et des difficultés rencontrées jusqu'à présent pour un dosage précis de cet élément.

Disposant avec la spectrophotométrie d'absorption atomique d'une méthode analytique précise et sensible bien adaptée au dosage en série dans les liquides et les organes, il nous a paru indispensable de reprendre l'étude du phénomène en nous attachant particulièrement à l'appréciation des variations de magnésium dans les tissus mous. En outre, nous avons dosé le magnésium érythrocytaire qui n'avait pas encore fait l'objet d'étude particulière à notre connaissance.

4 - APPORTS PERSONNELS :

4 - 1 - Matériel expérimental :

Quarante six rats Wistar mâles de 130 - 160 g, jeunes adultes ont été divisés en deux groupes de 16 et de 30 rats. Le premier groupe fut soumis à un régime déficient en magnésium, le deuxième à un régime normal pour rat. Ils ont tous reçu de l'eau à volonté et mangé à leur faim. Le régime carencé en Mg fabriqué au laboratoire selon les indications du Pr MAURAT, correspond à la formule suivante :

Caséine dévitaminée.....	250 g	Thiamine.....	0.037 g
Glucose.....	600 g	Riboflavine.....	0,037 g
Huile de germe de maïs.....	100 g	Pyridoxine.....	0,026 g
Ca CO ₃	20 g	Cyanocobalamine.....	22 µg

Ca H PO ₄	5 g	Acide nicotinique.....	0,187 g
K H ₂ PO ₄	5 g	Acide ascorbique.....	1 g
Na Cl.....	15 g	Tocophérol.....	0,037 g
Citrate ferrique.....	1,85 g	Panthénol.....	0,033 g
Mn SO ₄	0,25 g	Biotine.....	0,035 mg
K I.....	0,06 g	Acide folique.....	0,02 g
Cu SO ₄	0,02 g	Vit. K.....	0,05 g
Zn SO ₄	0,02 g	Acide para amino-benzoïque	0,100 g
Vit. A.....	75 000 U I	Chlorure de choline.....	0,5 g
Vit. D.....	15 000 U I	Inositol.....	0,25 g
		Méthionine.....	0,25 g

Le dosage de magnésium de ce "régime de carence" a donné la valeur de 6 mg/100 g d'aliments, alors qu'un "régime standard" renferme 100 mg de Mg/100 g d'aliments.

Les animaux sous régime carencé, divisés en quatre lots A, B, D, E, de quatre rats chacun, furent pesés plusieurs fois. Leur sang a été prélevé dans le sinus de l'oeil, après légère anesthésie à l'éther, pour l'évaluation du taux du magnésium plasmatique et globulaire. Le sacrifice des animaux a été réalisé par décapitation après anesthésie à l'éther sulfurique, le dernier prélèvement de sang étant fait par ponction cardiaque. Le foie, le coeur, le rein, le muscle lombaire prélevés ont été enveloppés dans du "Parafilm", mis dans des flacons, conservés au congélateur en attendant la minéralisation et le dosage du magnésium dans ces différents organes selon les méthodes décrites plus haut.

4 - 2 - Résultats :

4 - 2 - 1 - Croissance des rats sous régime carencé :

Bien que la prise de poids persiste chez les animaux soumis à la carence en magnésium, elle est nettement ralentie par rapport

à celle des témoins du même âge. On trouvera dans le tableau XXVII les résultats des pesées effectuées en cours de traitement et on pourra comparer ceux-ci à la courbe de la figure 33 correspondant à la moyenne du lot témoin.

. Les rats du lot D, de cinq semaines au départ, n'atteignent à la onzième semaine (après 45 jours de carence), que 194 à 206 g alors que les témoins de même âge dépassent 300 g.

. Les animaux du lot E, de 6 semaines au départ, sont nettement plus menus que les témoins puisque à 32 semaines (après 185 jours de carence), ils ont un poids nettement inférieur aux témoins de 15 semaines (340 g).

4 - 2 - 2 - L'aspect clinique de ces animaux carencés en Mg est caractéristique :

. les animaux carencés sont plus irritables que les animaux témoins. Ils s'agitent à la moindre incitation et cherchent à mordre ;

. ils prennent du poids, mais de moins en moins à mesure que la carence se poursuit et dans tous les cas beaucoup moins que les animaux témoins ;

. ils perdent leurs poils ;

. ils présentent une érythrose nette au bout des oreilles avec vasodilatation des capillaires au point de provoquer un saignement avec formation de petits caillots.

. enfin, apparaît une exophtalmie caractéristique.

4 - 2 - 3 - Variation du taux de magnésium tissulaire et sanguin :

Les résultats des dosages effectués sont reportés dans le tableau suivant : XXVIII

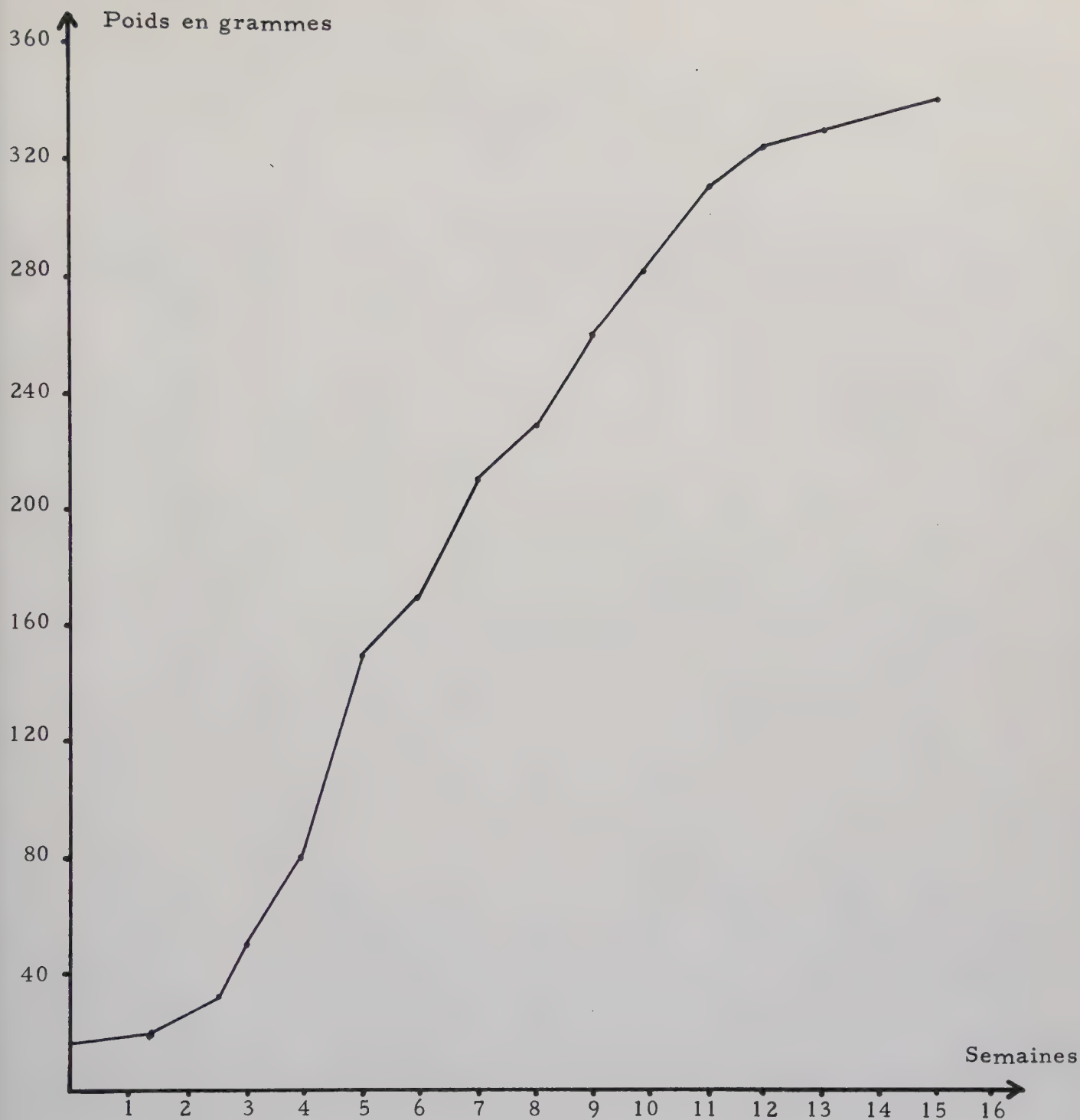


Figure 33

COURBE DE CROISSANCE DE RATS MALES SOUCHE WISTAR
EN FONCTION DE L'AGE

TABLEAU XXVII
VARIATION DU POIDS DES ANIMAUX SOUMIS A UN REGIME CARENCE
 + indiquant la date du sacrifice

	Départ	30è j	45è j	55è j	65è j	75è j	85è j	96è j	110è j	144è j	155è j
A ₁		192		216	220 +						
A ₂		160		177		192 +					
A ₃		162		182 +							
A ₄		172		191			207				
B ₁		190									
B ₂		135									
B ₃		160									
B ₄		163								202 +	
D ₁	152		196				247 +				
D ₂	168		194				235 +				
D ₃	143		194				260 +				
D ₄	172		206				239 +				
E ₁	200								241	262 +	
E ₂	177								224	250 +	
E ₃	175								227	248 +	
E ₄	175							252 +			
<u>Témoin</u>											
	160	260	310	320	330	330	340	340	340		

TABLEAU XXVIII

TAUX DE MAGNESIUM TISSULAIRE ET SANGUIN DES ANIMAUX SOUMIS A UN REGIME

CARENCE

	Date de sacrifice	mg/100 g de tissu frais				mg/litre		
		Rein	Muscle	Foie	Coeur	Plasma	G R	Plasma G R
A ₁	65è jour	21	27			30è j. 5	37	65è j. 5
A ₂	75è jour	17,5	21			30è j. 6,4	35	75è j. 8,3 ^h
A ₃	55è jour	18,7	20,7			30è j. 6,7	33	55è j. 4
A ₄	85è jour	15,4	24,9			30è j. 4,2	39	85è j. 4,4
B ₁		15,5			18,5	30è j. 5	37,5	130è j. 5,4
B ₂		16,40	23,15	19,60	17,20	30è j. 6,5	40	130è j. 6,6
B ₃	90è jour	19,5	29,8			30è j. 5,1	31,5	90è j. 4,8
								32,5

B ₄		18, 10	28, 40				6, 2 <u>144è j.</u>
D ₁	85è jour	18	18, 8	23, 3	20, 1	5, 2 <u>30è j.</u>	85è j. 35
D ₂	85è jour	19, 2	24, 1	28, 6	20, 4	5, 6 <u>30è j.</u>	85è j. 40
D ₃	85è jour	17, 8	26	23	18, 9	3 <u>30è j.</u>	85è j. 35, 5
D ₄	85è jour	19, 35	27, 2	25, 8	18	5 <u>30è j.</u>	85è j. 31, 5
E ₁							6, 7 <u>185è j.</u>
E ₂	155è jour	18, 50	21, 50	25, 80	18, 25	9, 2 <u>110è j.</u>	155è j. 34, 5
E ₃	158è jour	17, 50	27, 50	16, 30	18, 30	9, 2 <u>110è j.</u>	158è j. 38
E ₄	96è jour	14, 40	30		16, 20		96è j. 45
Témoin moyenne		(21, 83)	(22, 9)	(24, 2)	(20, 0)	(18, 1)	(54)

L'étude statistique de ces résultats et des valeurs obtenues sur les animaux témoins est réunie dans le tableau XXIX.

Les valeurs moyennes ainsi obtenues permettent de faire les constatations suivantes :

Le régime carencé influe fortement la teneur en magnésium du plasma et des globules rouges. Dès le 30^e jour, les chiffres sont très bas, se situant :

- pour le plasma : entre 7,9 et 3 mg/l avec une moyenne de 6,03, de $\sigma = 1,4$ et de $\sigma_M = 0,11$, tandis que nous avons obtenu une moyenne de 18,1 mg/l pour les témoins avec $\sigma = 2,4$, $\sigma_M = 0,58$.

- pour les globules rouges, les chiffres vont de 28,5 mg/l à 41 mg/l avec une moyenne de 35,8 mg/l, $\sigma = 6,3$ et $\sigma_M = 1,8$. Les témoins avaient une moyenne de 54 mg/l, $\sigma = 4,3$, $\sigma_M = 1,03$.

Les différences sont donc hautement significatives. Cependant, la baisse dans les globules rouges semble moindre que celle observée dans le plasma.

Avec notre régime où la carence magnésique n'est pas absolue, il semble que la chute tant plasmatique que globulaire reste stable à travers le temps (les résultats correspondant à D₁ et D₂ doivent être interprétés avec prudence, car le plasma du 85^e jour présentait une légère hémolyse) ; cette stabilisation persiste même pour les animaux carencés jusqu'au 155^e jour (E₂ taux plasmatique = 6,6 mg/l et globulaire = 34,5 mg/l).

- les taux tissulaires varient beaucoup moins que les taux sanguins. Il semble que les cellules résistent plus fortement aux modifications du taux de magnésium que le milieu extracellulaire. Cependant, à cela, font exception les globules rouges dont les enzymes membranaires, réglant les échanges, semblent plus sensibles au déficit.

TABEAU XXIX

COMPARAISON DES MOYENNES STATISTIQUES ENTRE LES TAUX DE Mg TISSULAIRE ET

SANGUIN DES ANIMAUX TEMOINS ET CARENCEES

	mg/100 g de tissu frais				mg/litre	
	Rein	Muscle	Foie	Coeur	Plasma	G.R.
Animaux carencés Nombre Moyenne 66 M	15	14	7	9	13	12
	17,79	24,9	23,2	18,42	6,03	35,8
	1,8	3,6	4,2	1,3	1,4	6,3
	0,45	0,94	1,56	0,43	0,11	1,8
Témoins Nombre Moyenne 66 M	29	27	13	30	17	17
	21,83	22,9	24,2	20,0	18,1	54
	2,91	4,0	1,7	1,94	2,4	4,3
	0,55	0,8	0,5	0,36	0,58	1,03

Il y a une baisse modérée de la teneur en magnésium du coeur, et du rein, qui ne s'accroît pas, même après une longue période de carence (cas de E_2 et E_3). La comparaison avec les témoins montre néanmoins une différence significative, puisque le calcul statistique donne une probabilité de $p = 0,0001$ pour le rein, $p = 0,05$ pour le coeur. Ces résultats confirment donc les observations de MARTINDALE. Par contre, pour le foie et le muscle, nous n'avons pas observé de différence significative entre les taux des animaux témoins et carencés, comme CHUTKON l'avait signalé, mais ces résultats infirment ceux de Mc INTYRE, DAVIDSON et MARTINDALE.

- sur une courte série, on a pu apprécier la rapidité de retour à la normale du taux plasmatique du Mg après institution de régime alimentaire normal. Quatre animaux (le lot C) ayant été soumis au régime carencé pendant trois mois, reçoivent du régime standard. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau XXX. On constate que la remontée est assez rapide puisque le Mg plasmatique passe de 4,6 - 6 mg/l à 15,4 - 16 mg/l après 13 jours de régime normal seulement.

TABLEAU XXX
TAUX DU MAGNESIUM PLASMATIQUE (en mg/l) EN REGIME CARENCE
SUIVI DE REGIME NORMAL

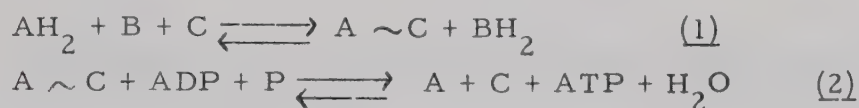
	1 mois de carence	3 mois de carence	13 jours de régime normal
C ₁	4,6	4,6	16
C ₂	5,5	5,5	16
C ₃	6,7	4,8	16,4
C ₄	52	6	15,4

D'autre part, nous basant sur les connaissances en clinique humaine d'hypomagnésémie dans l'hyperthyroïdie, nous avons étudié la parathyroïde des animaux en carence magnésique; nous n'avons trouvé de différence avec les témoins, leur aspect histologique était identique à celui des glandes d'animaux normaux. En aucun cas, l'aspect histologique était celui d'une parathyroïde hyperactive ; l'aspect était celui d'une parathyroïde normale ou d'une parathyroïde hypo-active. Ceci s'explique par la quasi constance d'une élévation de la calcémie, dans ces cas, la moyenne étant de 115 mg/l.

4 - 2 - 4 - Etude de la respiration des mitochondries de foie de rats élevés au régime hypomagnésique :

Une étude, inspirée des travaux de VITALE et Coll. a été effectuée sous la direction de BECHTEL (Laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Besançon), sur les mêmes animaux carencés pour déterminer la capacité de respiration, autrement dit de couplage de la phosphorylation aux oxydations, des mitochondries isolées du foie.

On peut résumer l'ensemble des phénomènes de la phosphorylation oxydative par les réactions :



A ~ C étant la substance intermédiaire fournissant l'énergie nécessaire à la phosphorylation.

Les inhibiteurs de la phosphorylation agissent au niveau de la deuxième réaction, alors que les inhibiteurs de la respiration interviennent au niveau de la première.

PRINCIPE :

Lorsqu'on introduit le substrat (ici le succinate), dans une préparation de mitochondries, une légère absorption d'oxygène se remarque en l'absence d'ADP. L'addition d'ADP provoque une augmentation rapide de la consommation d'oxygène, la durée de celle-ci dépendant de la quantité d'ADP introduite dans le mélange.

La quantité d'oxygène utilisée est proportionnelle à la quantité d'ADP transformée en ATP.

Le rapport $\frac{\text{ADP}}{0}$ (équivalent de $\frac{P}{0}$) peut être directement calculé à partir du tracé polarographique obtenu à l'électrode indicatrice de l'oxygène (voir figure 34).

La consommation d'oxygène après l'addition de mitochondries et de succinate est représentée par les pentes A-B et B-C de la courbe, là il n'y a pas emmagasinage d'énergie.

Y déterminé par la distance entre les points d'inflexion C et D après addition d'ADP, exprime l'ampleur de la respiration stimulée par l'ADP.

X : oxygène total contenu dans le milieu.

De ces données et de la quantité d'ADP transformé, on déduit le rapport $\frac{P}{0}$:

$$\frac{\text{Oxygène contenu dans le milieu en micro-mole}}{X \text{ (nombre de division)}} \times Y \text{ (nombre de division)}$$

$\times 2$ (pour exprimer en micro-atome d'O) = micro-atome d'O utilisé

$$\frac{\text{ADP (quantité absolue dans le milieu en micro-mole)}}{\text{micro-atome d'O}} = \frac{\text{ADP}}{0}$$

Les mitochondries sont séparées selon la technique de WEINBACH avec quelques modifications sur les forces centrifuges : respectivement 650 g (rayon moyen pour la première centrifugation destinée à l'obtention d'un surnageant renfermant les mitochondries à partir d'un broyat de foie) et 1 200 g (rayon moyen au moment du lavage des mitochondries qui alors, sédimentent). Pendant toute la durée de l'expérience, la température est maintenue à 0° C. Le liquide extractif est une solution de saccharose 0,25 M neutralisé avec du Tris M de façon à obtenir un pH 7,2 - 7,3.

Le succinate est utilisé comme substrat à la concentration finale de 5m mole. La consommation d'oxygène (QO_2) est mesurée par la méthode polarographique (oxygraphe de Gilson à micro-cathode vibrante). Les figures 34, 35 représentent le graphique obtenu avec des animaux témoins et carencés. Le passage de l'état 3 à l'état 4 est obtenu par adjonction au milieu de 50 nM d'ADP.

Par rapport aux témoins, il apparaît au niveau de la mitochondrie de foie de rat carencé en Mg, un net découplage des oxydations phosphorylantes, bien que la respiration continue, ce qui se manifeste par une pente ininterrompue.

Par ailleurs, nous avons remarqué une surcharge lipidique du foie des rats ainsi carencés, probablement secondaire à l'inhibition d'enzyme lipolytique ayant comme co-facteur le magnésium. Le rôle de cette surcharge en graisse sur le découplage observé mérite une étude ultérieure

La carence en magnésium correspond donc à l'action observée avec les inhibiteurs de la phosphorylation agissant au niveau de la réaction 2.

Oxygène

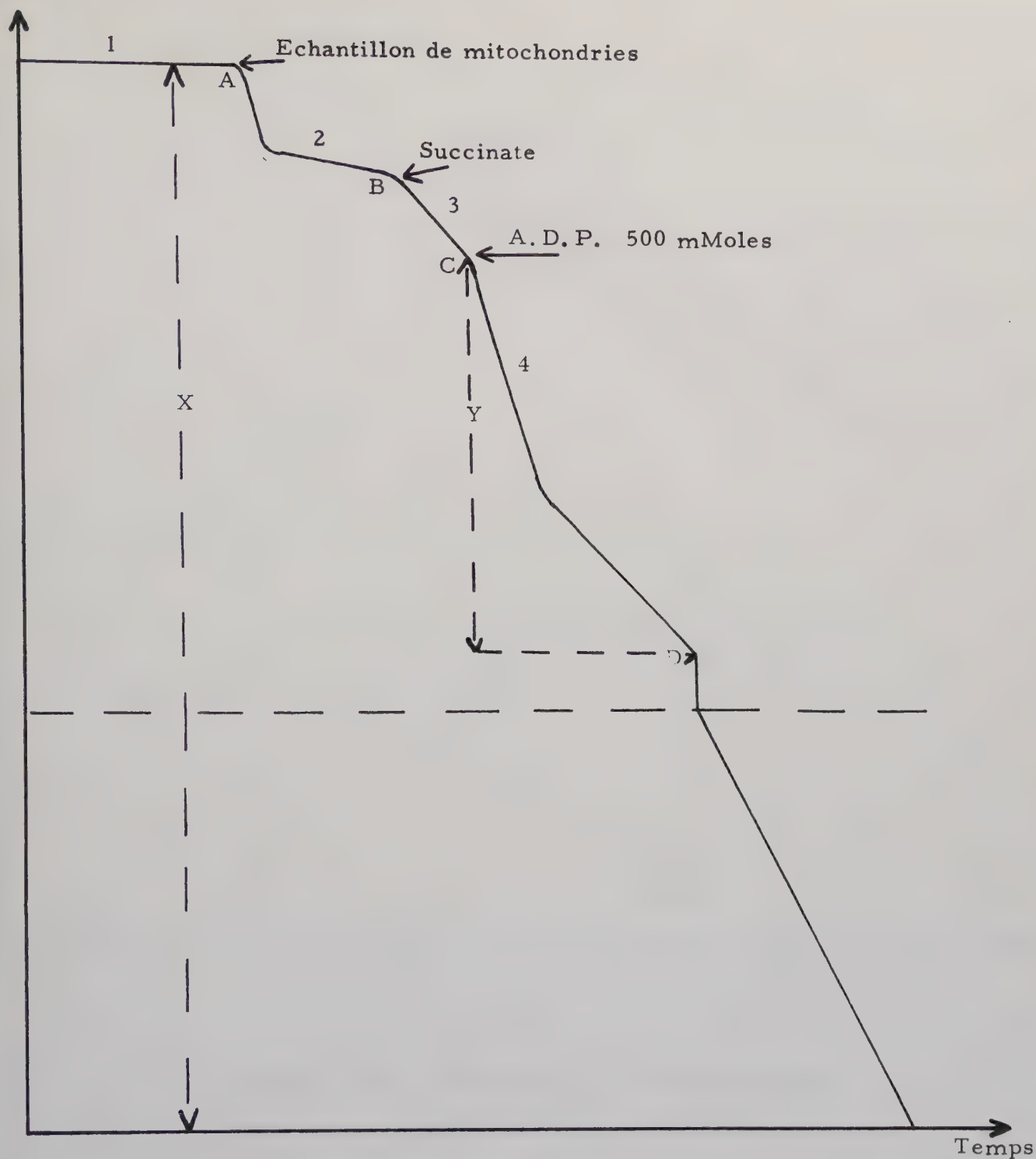


Figure 34

CONSOMMATION D'OXYGÈNE DES MITOCHONDRIES D'ANIMAUX TEMOINS
AU COURS DE LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE

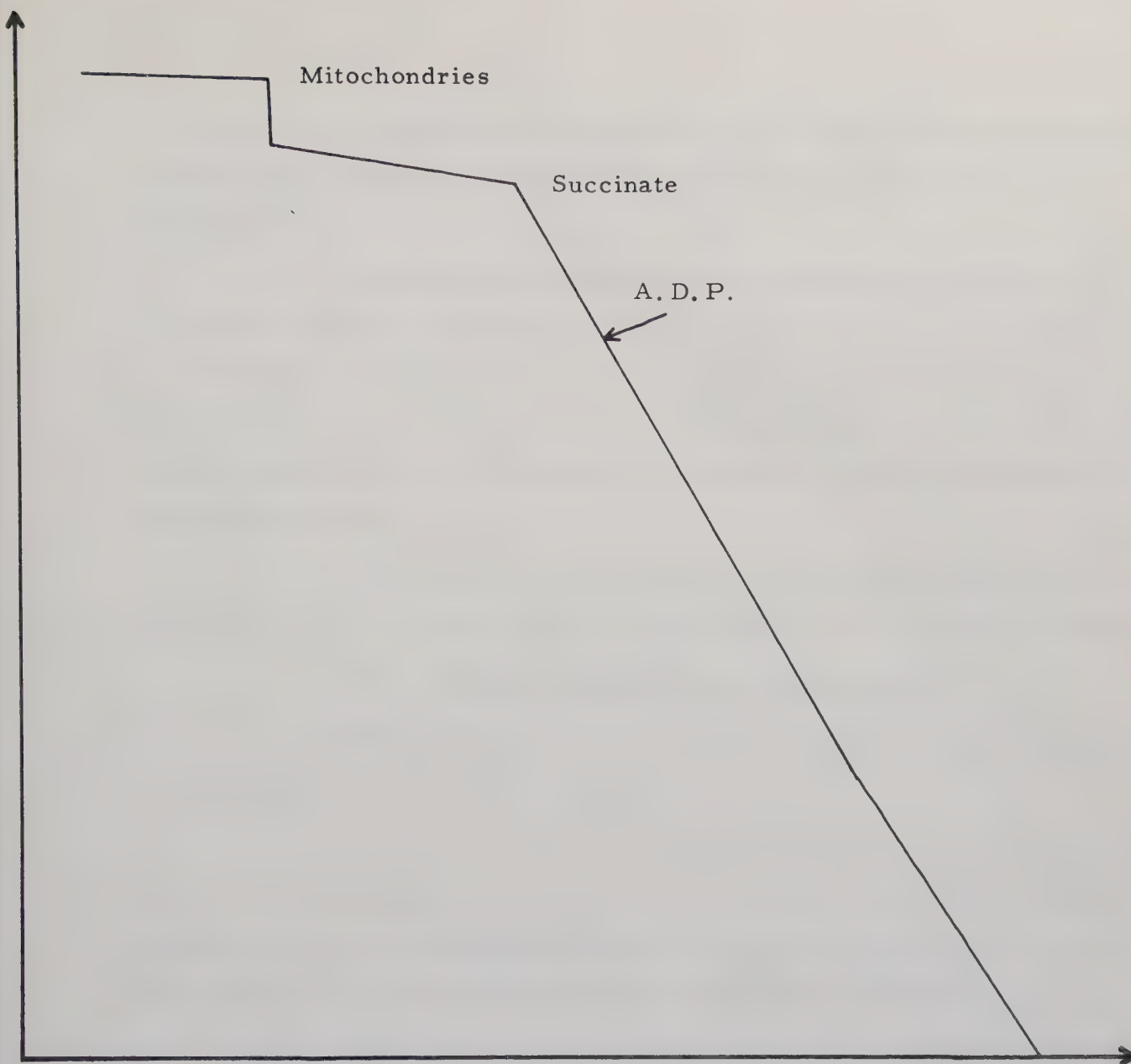


Figure 35

CONSOMMATION D'OXYGENE DE MITOCHONDRIES
D'ANIMAUX CARENCES EN MAGNESIUM

5 - ETUDE DES INTERRELATIONS ENTRE LA CARENCE EN MAGNESIUM ET LA PARATHYROÏDE, LE METABOLISME DU CALCIUM ET DU POTASSIUM :

Le magnésium ne doit pas être considéré isolément dans l'organisme vivant : on sait, en effet, que les variations de son taux sont en corrélation assez étroite avec celui du calcium, lui-même influencé par la parathyroïde. On a reconnu, d'autre part, que l'augmentation de la kaliémie aggravait les conséquences biologiques et physiopathologiques de la carence magnésique.

Les résultats précédemment rapportés de carence expérimentale permettent d'approfondir nos connaissances sur ces interrelations

5 - 1 - Carence magnésique et parathyroïde :

De nombreux travaux suggèrent l'intervention des parathyroïdes dans le métabolisme du magnésium.

L'administration d'extrait parathyroïdien provoque une augmentation de la magnésémie chez le Chien et le Rat (27) (41) (54) (186) et une augmentation de la magnésurie chez l'Homme (164), le Rat (92), et le Chien (141), une baisse du magnésium osseux chez le Rat (27).

Chez l'Homme, un abaissement du magnésium plasmatique (1) (7) (57) et du magnésium globulaire (163) (177) a été trouvé dans plusieurs cas d'hyperparathyroïdisme primaire. La magnésurie était augmentée. Après ablation de la tumeur parathyroïdienne, le magnésium plasmatique et érythrocytaire remonte lentement ; nous-mêmes avons observé un cas d'hypermagnésémie après ablation d'un adénome parathyroïdien. Il faut cependant signaler une constatation paradoxale d'une hypomagnésémie survenant après ablation d'un adénome parathyroïdien alors que le taux pré-opératoire du magnésium plasmatique était normal (56) (63).

(131) ; nous avons observé un cas semblable d'hypomagnésémie de l'ordre de 12,5 mg/litre après ablation d'une tumeur maligne de la parathyroïde.

La balance magnésienne est négative en cas de tumeur parathyroïdienne sécrétante et devient positive après parathyroïdectomie partielle par suite d'une diminution de l'excrétion urinaire (1) (7) (51) (56) (63) (122) (163). La balance est positive même si la magnésémie est basse après l'ablation, ceci laisse à penser que le squelette et les tissus récupèrent le magnésium perdu pendant la période d'hypersecrétion parathyroïdienne.

L'hormone parathyroïdienne influe aussi, en la favorisant, sur l'absorption intestinale, puisque l'excrétion fécale, faible chez l'hyperparathyroïdien, s'élève après ablation de la tumeur (63).

Chez le Rat et le Chien, la parathyroïdectomie est suivie d'une chute de la magnésémie parallèle à celle de la calcémie mais de moindre importance (41) (56) (111) (186) et d'une augmentation passagère de l'élimination urinaire du magnésium (11) (131) qui va de pair avec l'augmentation de la calciurie (12) (162). L'injection d'hormone parathyroïdienne à des rats parathyroïdectomisés entraîne une diminution de l'excrétion urinaire du calcium et du magnésium, contrairement à ce que l'on observe chez l'animal intact. Ceci donne à penser que l'hormone parathyroïdienne favorise la réabsorption tubulaire des deux cations. La même observation a été faite chez l'Homme : l'injection d'hormone parathyroïdienne à des sujets atteints d'hypoparathyroïdie essentielle ou secondaire à une thyroïdectomie, diminue l'élimination urinaire du calcium et du magnésium (46) (88).

A l'inverse, les modifications du magnésium plasmatique influencent la sécrétion parathyroïdienne. Les rats déficients en magnésium développent une hypercalcémie significative : dans notre expérience, le taux moyen de la calcémie des rats carencés en magnésium était de 115 mg/l.

On observe également, en règle générale, une hypophosphatémie, une hyperphosphaturie, autrement dit, une augmentation de la clearance des phosphates ; tous ces changements suggérant un hyperparathyroïdisme (51) (111) (112) (158).

GITELMAN, KUKOLJ WELT ont étudié l'effet de la carence magnésienne concomitamment sur les rats intacts et sur les rats parathyroïdectomisés :

La déficience en magnésium chez le Rat intact entraîne une nette augmentation de la calcémie (avec forme ionique élevée et forme liée aux protéines, normale), une hypophosphatémie et une hyperphosphaturie.

Par contre, les rats parathyroïdectomisés ont une calcémie qui n'est pas supérieure à celle des témoins non déficients en magnésium : pas de modification de la phosphatémie, mais une phosphaturie élevée.

On peut déduire que la phosphaturie est indépendante de l'état de fonctionnement des glandes parathyroïdes, tandis que l'hypercalcémie et l'hypophosphatémie au cours de la carence, exigent une parathyroïde normale.

Mc INTYRE et DAVIDSON ont attribué l'hypercalcémie à une balance positive par une augmentation de l'absorption intestinale et une diminution de l'élimination urinaire et fécale. Ceci peut être interprété comme étant la conséquence d'un mécanisme commun de transport de ces éléments à travers l'intestin et les tubules rénaux : en cas de déficit en magnésium, le calcium est mieux absorbé au niveau de ces deux organes.

RICHARDSON et WELT (134) ont démontré qu'une balance positive en calcium n'est pas indispensable pour provoquer une hypercalcémie par une expérience comparable aux précédentes. On pourrait trouver une explication de ce phénomène dans les variations de la répartition du calcium plasmatique entre les différentes formes : la carence en Mg aurait pour

conséquence une diminution du taux de calcium ionisé par suite de la chélation du calcium par les sites occupés auparavant par le magnésium. Chez l'animal à parathyroïde intacte, cette chute du calcium ionisé stimulerait la parathyroïde et la concentration du calcium ionisé serait restaurée.

Mais ce mécanisme ne peut expliquer l'augmentation de la concentration en calcium ionisé observée chez les rats déficients en magnésium, avec parathyroïde intacte et qui peut être stimulée par l'administration d'extrait parathyroïdien.

Puisque la présence d'une parathyroïde intacte est essentielle pour cette réponse, on peut penser que certaines conséquences de la déficience en magnésium sont capables de modifier le processus régulateur de la glande parathyroïde qui assure le maintien d'une concentration normale en calcium ionisé, sans que ceci implique nécessairement une augmentation de la sécrétion de PTH dans ces cas ; mais il est probable que cette augmentation intervient puisqu'on observe une diminution de la concentration de calcium ionisé chez les rats déficients en Mg, parathyroïdectomisés.

GITELMAN, KUKOLJ et WELT (50) ont démontré, par ailleurs, que l'activité de la parathormone est supprimée par l'hypermagnésémie. De plus, la perfusion hypermagnésique de la glande parathyroïde chez la Chèvre, entraîne une diminution de la sécrétion de la parathormone mesurée directement dans le sang de la veine efférente par méthode radio-immunologique (25).

Une autre expérience d'hypermagnésémie provoquée par injection sous-cutanée de chlorure de magnésium fut réalisée par GITELMAN (49) sur des rats intacts et sur des rats parathyroïdectomisés, tous soumis à la néphrectomie, pour éliminer l'effet de l'excrétion urinaire du calcium.

Cet auteur observe une nette diminution de la calcémie des animaux avec parathyroïde intacte ; au contraire, les animaux parathyroïdectomisés ne développent pas de modification de la calcémie. La fonction parathyroïdienne est bien en rapport avec le taux de Mg plasmatique, elle est inhibée par l'hypermagnésémie.

L'ensemble de ces observations semble démontrer que la concentration en magnésium du plasma influence l'activité fonctionnelle de la glande parathyroïdienne.

Cependant, il faut noter que les modifications du métabolisme du magnésium, produites par administration de PTH et parathyroïdectomie ne sont pas aussi reproductibles et persistantes que les effets sur le métabolisme du calcium dans les mêmes circonstances.

En outre, les rats parathyroïdectomisés carencés en magnésium ont une magnésémie plus basse et un fémur plus riche en magnésium que les rats intacts nourris avec le même régime ; cette constatation permet de penser à l'existence, chez ces derniers, d'une hyperactivité parathyroïdienne entraînant une mobilisation du magnésium squelettique (59).

En ce qui concerne l'élimination urinaire, on a considéré que si l'habituelle hypercalciurie de l'hyperparathyroïdie n'était pas retrouvée dans les expériences de carence en magnésium, c'est que celle-ci dépend du taux de calcium filtré par le glomérule. Une série d'expériences permet d'admettre l'existence d'un effet direct de l'hormone sur la réabsorption tubulaire : la calciurie augmente transitoirement après parathyroïdectomie chez le Rat (12)(162), même si l'animal reçoit un régime pauvre en calcium (108) et s'abaisse sous l'effet de l'hormone parathyroïdienne.

La perte urinaire en calcium comme en magnésium, secondaire à la libération osseuse des deux ions, serait limitée par un effet direct

de l'hormone qui favoriserait leur réabsorption par le tubule rénal. En outre, l'hormone parathyroïdienne aurait un effet favorable sur la conservation du stock magnésien, en augmentant l'absorption intestinale du magnésium. L'existence de ce double mécanisme expliquerait la discrétion des variations du magnésium plasmatique dans les conditions physiologiques. En cas d'hyperparathyroïdie, la déplétion tissulaire entraînant une augmentation de la magnésémie et de la filtration glomérulaire, l'emporterait sur le mécanisme de conservation ; en cas d'hypoparathyroïdie aiguë, on observerait de même une perte du stock magnésien, en raison, cette fois-ci, d'une diminution de la capacité du tubule rénal à réabsorber le magnésium en l'absence de l'hormone parathyroïdienne. Cependant, l'existence de plusieurs cas d'hypoparathyroïdie plaide en faveur de l'action plus discrète de cette glande sur le métabolisme du magnésium que sur celui du calcium.

D'autre part, il n'y a pas de contradiction entre l'hypermagnésémie obtenue par injection de PTH ou observée dans certains cas d'hyperparathyroïdie primaire, et l'hypomagnésémie retrouvée au cours d'adénomes parathyroïdiens. Dans le premier cas, s'extériorise l'effet direct et momentané de l'hormone parathyroïdienne qui enrichit le plasma avec du Mg enlevé à l'os (27), alors que le second cas correspond à des affections d'évolution chronique durant lesquelles la soustraction tissulaire du magnésium et sa fuite urinaire ont appauvri le stock magnésien de l'organisme.

Dans la déficience en magnésium du Rat, il y a une nette hyperphosphaturie, compatible avec une hyperparathyroïdie. Mais cette dernière ne semble pas être la seule responsable car l'hyperphosphaturie est observée aussi chez des sujets carencés, qu'ils aient ou non leur parathyroïde. Autrement dit, la parathyroïde peut jouer un rôle dans la phosphaturie, mais n'en est pas le facteur essentiel. Dans la déficience en Mg, on peut ainsi observer une néphrocalcinose localisée dans la branche ascendante de

l'anse de Henlé, de même que d'autres altérations fonctionnelles non associées aux lésions structurales détectables, pouvant être responsables de l'hyperphosphaturie ; celle-ci survient simultanément avec la diminution de la filtration glomérulaire (déduite de l'augmentation de l'urée) et une hypophosphatémie. Cette combinaison implique une diminution de la réabsorption tubulaire des phosphates indépendamment de l'activité parathyroïdienne.

On peut donc conclure que l'hypercalcémie et l'hypophosphatémie dans la déficience en magnésium exige une activité parathyroïdienne, alors que d'autres mécanismes interviennent pour expliquer l'hyperphosphaturie.

Le mode d'action de l'hormone parathyroïdienne sur le métabolisme cellulaire du magnésium est mal connu. On a avancé qu'elle augmentait le passage à travers la membrane cellulaire, du magnésium (24) et qu'elle favorisait sa fixation sur les mitochondries (132). WALLACH et Coll. (176), grâce à l'utilisation du ^{28}Mg ont pu avancer que, sans modifier de façon appréciable la concentration cellulaire du magnésium, l'hormone augmentait la rapidité des échanges magnésiques, surtout au niveau du muscle squelettique. Ce qui infirme l'hypothèse selon laquelle les modifications magnésiques observées sous l'effet de la PTH seraient secondaires à l'hypercalcémie qu'elle provoquait : en effet, l'hypercalcémie aigüe s'oppose à la pénétration intra-cellulaire du magnésium (175).

5 - 2 - La carence en magnésium : rapports entre troubles du métabolisme du magnésium et du calcium

Chez le Rat, la carence en magnésium s'accompagne, le plus souvent, d'hypercalcémie. Tandis que chez l'Homme, le Chien, et les bovins, il n'est pas rare d'observer, associée à l'hypomagnésémie, une hypocalcémie, qui n'est d'ailleurs corrigée que par apport de magnésium. C'est

ainsi que nous avons observé récemment le cas d'une jeune femme de 28 ans présentant, à la suite d'une grossesse, des crises de tétanie très graves. Un traitement par injections massives et répétées de gluconate de calcium s'est avéré incapable de faire remonter la calcémie (restant inférieure à 90 mg/l), alors que l'administration orale de lactate de magnésium associée à un traitement hormonal et vitaminique D a permis, en 6 mois, la normalisation de la calcémie et la disparition des symptômes cliniques. Ce phénomène a pu être reproduit expérimentalement chez des volontaires recevant une ration, insuffisante en magnésium, mais équilibrée en calcium (153).

L'hypocalcémie de la carence humaine en Mg a été attribuée à un abaissement de l'absorption calcique (128). La positivation de la balance calcique sous magnésothérapie, observée par SORLET et Coll., est un argument en faveur de ce mécanisme (86) (142) (145). Chez les bovins, l'hypocalcémie est observée aussi bien chez l'adulte en carence magnésique pure que dans la tétanie d'herbage mais c'est chez le Veau que l'étude de ce phénomène a été la plus poussée. R. H. SMITH (157) a montré que l'apparition d'hypocalcémie pendant la carence en magnésium peut être évitée par l'administration de vitamine D, à condition que cet apport soit nettement supérieur aux besoins normaux des animaux, ce qui tend à démontrer, dans la carence en Mg, la diminution de l'activité de la vitamine D sur le métabolisme. C'est d'ailleurs cette notion qui avait fait associer la vitamine D au traitement du cas mentionné ci-dessus.

Dans le tableau suivant, sont relevés d'une part, la teneur en vitamine D du lait carencé en magnésium, et d'autre part, le niveau critique du magnésium plasmatique en dessous duquel apparaît l'hypocalcémie. On constate une relation quantitative étroite entre ces deux facteurs (compte tenu des détails expérimentaux différents).

AUTEURS	Teneur du lait en vitamine D (U I/l) (Estimation d'après les données des différents auteurs)	Niveau critique du Mg plasmatique mg/100ml
R. H. SMITH (157)	10	1, 3
PARR (123)	50	0, 8
LARVOR, GIRARD, BROCHARD (86)	100	0, 6
BLAXTER et ROOK (13)	800	Pas de niveau critique

L'hypocalcémie ne résulte pas d'une hypersecrétion de thyrocalcitonine, puisque la thyroïdectomie d'un Veau carencé en Mg et en état d'hypocalcémie, n'entraîne pas la remontée du calcium sanguin (85).

La différence de réaction de la calcémie à une carence en magnésium entre les rongeurs, d'une part, les ruminants, le Chien et l'Homme, d'autre part, serait-elle due à des différences physiologiques interspécifiques ou à la nature différente de l'alimentation ? Des rats et des chiens soumis à un même régime carencé en magnésium manifestent des réactions différentes ; le calcium plasmatique baisse chez le Chien, celui du Rat n'est pas modifié (147), alors qu'on observe une hypercalcémie chez ce dernier, lorsqu'il est nourri avec un régime carencé en Mg spécialement préparé pour lui.

FOURMAN pense qu'il existe également, dans le cas d'hypocalcémie, une perte d'efficacité de l'hormone parathyroïdienne sur le métabolisme du calcium osseux. Cette hypothèse est basée sur l'observation de malades atteints de stéatorrhée compliquée d'hypocalcémie et de tétanie. L'injection d'hormone parathyroïdienne s'avère sans grand effet, tandis

que la recharge en magnésium finit par corriger l'hypocalcémie (44). Deux phénomènes sont à considérer, si l'on veut tenter d'établir un lien logique entre l'hypocalcémie et la carence magnésique : l'existence de manifestations évoquant une hyperparathyroïdie et celle de troubles du métabolisme osseux. A l'aide de ^{45}Ca , LARVOR (86) a observé un ralentissement de la fixation et de la libération du Ca par l'os, cependant qu'il existe une baisse de la phosphatase alcaline (117).

Cet hyperparathyroïdisme est peu compatible avec une hypocalcémie à moins d'admettre avec LARVOR (87) que le phénomène primitif est un trouble du métabolisme osseux, peut être dû à la diminution de l'activité des enzymes ayant le magnésium comme activateur (117). Le ralentissement des mouvements du calcium osseux qui en résulte serait à l'origine de l'hypocalcémie qui, elle-même, déclencherait une réaction parathyroïdienne. Mais celle-ci est incapable de corriger la baisse du calcium plasmatique, de même qu'est inefficace l'apport exogène d'hormone parathyroïdienne ou de vitamine D. Ce qui n'exclut pas la possibilité d'une action directe de la carence en magnésium sur les parathyroïdes.

Cette hypothèse se trouve renforcée par les constatations que nous avons précédemment rapportées concernant les modifications d'activité enzymatique chez les animaux soumis à un régime carencé en magnésium.

Le retour à la normale de la calcémie sous l'effet de la seule recharge en magnésium suggère que le calcium est à nouveau mobilisé à partir de l'os et des tissus mous, à mesure qu'une quantité croissante de Mg devient utilisable grâce aux mécanismes enzymatiques.

Les expériences sur le Rat furent reprises par Mc MANUS et HEATON (98) pour préciser les conditions dans lesquelles se produit l'hypercalcémie. Ces auteurs observent que le taux de calcium plasmatique

dans un régime carencé en Mg, dépend de la teneur en calcium du régime. Si cet apport est normal, les animaux développent une hypercalcémie. Si le régime est déficient en Mg et en Ca (2 mg/100 g), ils développent une hypocalcémie ; la répletion en magnésium provoque une augmentation à la fois du Mg et du Ca plasmatiques.

La déficience en Mg abaisse l'excrétion urinaire de l'hydroxyproline. Cette dernière provenant du catabolisme du collagène, témoigne d'une ostéolyse augmentée, entraînant par conséquent, une hypercalcémie. La répletion en Mg ramène cette excrétion à la normale.

Les rats parathyroïdectomisés, nourris avec un régime déficient à la fois en Mg et en Ca, ont une concentration plasmatique en Ca encore plus basse que les animaux semblables nourris avec un régime seulement déficient en Ca. Là encore, on peut conclure que l'hypocalcémie est le résultat d'une réduction du catabolisme de l'os sous la dépendance de la déficience en magnésium qui agit directement sur l'os.

La réaction du Rat à la déficience en magnésium et en calcium, est identique à celle des autres animaux en carence magnésique seulement. Cette différence de comportement est due à l'absorption intestinale en Ca relativement plus grande chez le Rat.

L'existence d'une réduction de la calciurie, malgré l'hyperparathyroïdie, au cours de la déficience en magnésium chez le Rat, a été discutée plus haut ; elle a été attribuée à une plus grande réabsorption tubulaire rénale pour deux raisons : hyperactivité parathyroïdienne et compétition entre Ca et Mg dans la réabsorption tubulaire rénale, provoquant une hausse de la réabsorption du Ca en cas de déficit en Mg.

Des relations certaines existent entre la nutrition magnésienne et le métabolisme du calcium ; cependant, un certain nombre de contradictions en rendent l'analyse difficile.

5 - 3 - Physiopathologie de la néphrocalcinose au cours de la déficience en magnésium :

L'hyperactivité parathyroïdienne et l'hypercalcémie qui en résulte, sont deux conditions favorables aux dépôts calciques dans les tissus au cours de la déficience en magnésium ; elles ne semblent pas être suffisantes pour FARNELL qui a rarement observé des calcifications tissulaires en l'absence de traitement cortisonique (43). A ces arguments, on joint l'existence, au cours de l'hyperparathyroïdie comme de la carence en Mg, d'une hypercitrémie et d'une augmentation du taux de citrates dans l'os. Cependant, à l'inverse de ce que l'on observe dans l'hyperparathyroïdie, la citraturie est diminuée dans la carence en Mg, ce qui semble indiquer une augmentation de la réabsorption tubulaire des citrates. L'hypocitraturie peut être considérée comme un facteur étiologique essentiel dans l'apparition de néphrocalcinose, l'acide citrique solubilise les sels de calcium ; en son absence, les sels de calcium, tels les phosphates, par suite du milieu alcalin, trouvent les meilleures conditions de précipitation. A l'inverse, l'augmentation des citrates urinaires a un effet préventif sur la calcinose rénale des rats carencés en Mg (90), tandis que l'injection des sels de magnésium augmente la citraturie (52).

La déficience en Mg a, en plus, un effet direct sur le métabolisme des citrates, à côté de l'action indirecte par l'intermédiaire des parathyroïdes. De nombreuses enzymes ne sont actives qu'en présence du Mg^{++} et parmi celles du cycle de KREBS, la malico-déshydrogénase qui catalyse la déshydrogénation du malate en oxalacétate ; son inhibition provoque l'accumulation de citrate par blocage du cycle. L'absence du Mg^{++} se traduit par une perturbation du métabolisme des citrates, avec comme conséquence une augmentation de la concentration sanguine et tissulaire de ceux-ci.

La néphrocalcinose n'est pas seulement due à l'hypocitra-

turie, car le magnésium a un effet direct sur la solubilisation des phosphates et oxalates de calcium. Le mécanisme de ce processus de solubilisation est hypothétique. On a évoqué le rôle du magnésium dans le maintien de l'intégrité des mucopolysaccharides. En effet, les calculs ont une matrice mucolde. Toute cause provoquant la formation de cette matrice traduit une perturbation du métabolisme des mucopolysaccharides, conduit au dépôt calcaire comme en cas de carence en magnésium.

On verra plus loin, dans les facteurs d'aggravation, que la composition du régime, comme l'institution de certains traitements, a une influence dans la néphrocalcinose. Par exemple, si l'apport phosphoré est suffisamment réduit, tous les phosphates filtrés sont réabsorbés par le tubule rénal dans la lumière duquel aucune précipitation calcique ne survient en dépit d'un taux bas de citrate (90). A l'opposé, l'augmentation de l'apport en phosphate aggrave les précipitations calciques (22).

D'ailleurs, de récents travaux ont pu montrer chez le cobaye en carence magnésique, l'existence d'une hyperphosphatémie alors même que l'apport en phosphate était normal. La cause semble en être une atteinte rénale. En effet, la clearance des phosphates, de même que la clearance de la créatinine, n'atteignait que la moitié de celle des témoins. Ces altérations sont corrigées par l'administration d'un sel de magnésium. La calcémie de ces animaux était restée normale. Ainsi, se trouve créé un déséquilibre phospho-calcique favorisant les précipitations des sels de calcium (115).

5 - 4 - Rapports entre potassium et carence en magnésium :

C'est en 1951 que COLTOVE a signalé pour la première fois (31) l'existence d'une déficience cellulaire en potassium, secondaire à la

carence en magnésium ; ceci a été confirmé par plusieurs auteurs (100) (112) (184). KASCHIWA (76) observe sur des rats déficients en Mg des altérations rénales semblables à celles que l'on trouve dans les carences en potassium, avec des calcifications en plus et des inclusions graisseuses en moins.

Plus récemment, JERRY (172) a montré que les rats soumis à un régime carencé conservent leur taux de potassium et de chlorure à un niveau constant pendant les 14 premiers jours, les modifications ne survenant qu'à partir de cette date.

Au bout de 2 à 3 semaines de carence en Mg chez des rats recevant une ration potassique normale, apparaît une polyurie avec perte du pouvoir de concentration des urines, partiellement résistante à la vasopressine, et un trouble d'élimination des ions H^+ objectivé par une diminution de l'acidité titrable urinaire, particulièrement lors de l'épreuve d'acidification par le chlorure d'ammonium (158). Cette perturbation du pH urinaire, déjà notée dans les carences en potassium, a été rapportée à une altération du système de l'anhydrase carbonique. En fait, on n'a pas encore prouvé l'existence d'une relation entre cette enzyme et le magnésium.

Parallèlement à la chute du magnésium musculaire et plasmatique, il a été noté une baisse du potassium du muscle squelettique (100) (104) (184), du myocarde (104) (152), de la médullaire rénale (100) et du foie (104), même si l'apport potassique est augmenté. La kaliurie s'élève. La kaliémie est variable : normale (158) (184) ou abaissée (152) chez le Rat, abaissée chez l'Homme (153), le jeune Chien (171) et le Singe (173). Par contre, SMITH avait observé après administration par injection de Mg_2SO_4 au Chien, une chute du potassium plasmatique allant jusqu'à 64 % du taux normal.

Les études faites par PETERSON ont montré que la perte potassique durant le déficit en magnésium peut être prévenue par administration de sel de magnésium. Ce dernier n'agit pas sur l'absorption du potassium, mais inhibe la sécrétion de ce dernier dans la lumière intestinale (129).

La restauration du potassium musculaire, après un régime hypomagnésique, ne peut être obtenue par le seul apport du potassium, la présence de Mg étant indispensable (183).

On admet que le potassium quitte les cellules pour les espaces extra-cellulaires à la suite d'une altération du système enzymatique qui commande les échanges transmembranaires. La déplétion potassique magnésio-dépendante serait due à l'existence d'une relation étroite entre l'activité de l'adénosine triphosphorylase ayant comme co-enzyme le Mg et la capacité de la pompe cationique de la cellule à maintenir un certain gradient de potassium intracellulaire (183).

Le phénomène a été étudié *in vitro* (184) : un diaphragme de Rat perd son potassium s'il est placé dans un milieu sans magnésium, même si la teneur en potassium du milieu est satisfaisante. D'autre part, l'addition de Mg évite les pertes de K d'un diaphragme placé dans un milieu dépourvu de potassium. La cinétique de la fuite du potassium à partir du diaphragme est supérieure à celle du magnésium (183). L'exposition *in vitro* de diaphragme de Rat dans un milieu maintenu à basse température provoque une perte de potassium supérieure à celle du magnésium. L'azotémie qui accompagne la déficience en Mg et en K est réversible par restauration, à la fois du K et du Mg et non par répletion du K seul.

L'hyperkaliurie ramène au taux initial ou à un niveau plus bas, la valeur du potassium plasmatique.

La polyurie observée chez les rats carencés en magnésium, est certainement due à une diminution de l'hyperosmolarité de la médullaire rénale comme cela a été démontré dans les dépletions potassiques ainsi que dans les hypercalcémies avec néphrocalcinose (101) (102).

La déficience en potassium retentit de son côté sur le métabolisme du magnésium. On observe chez le Rat en carence potassique, outre une diminution de la kaliémie et de la teneur en potassium des muscles cardiaque (31) (152) et squelettique (184), une chute du magnésium myocardique. Le taux de la magnésémie est variable. L'activité de l'adénosine triphosphorylase serait diminuée non seulement en l'absence de magnésium, mais aussi en l'absence de potassium (152).

On connaît moins bien le retentissement de la carence en magnésium sur le métabolisme du potassium chez l'Homme. Cependant, une augmentation de la kaliurie a été notée de même que la correction potassique par le simple traitement magnésien substitutif qui réduit la fuite intestinale du potassium endogène (129) (153).

Sur 50 échantillons de sang de malades présentant une kaliémie inférieure à 3,7 meq/l, nous n'avons observé que quatre diminutions significatives de Mg plasmatique qui d'ailleurs dans ceux cas, pouvaient correspondre à une hémodilution (l'osmolarité était inférieure à la normale). Dans la même série, nous avons relevé 7 diminutions de Mg érythrocytaire dont aucune ne correspondait à une diminution du potassium globulaire. Il semble donc que chez l'Homme, il soit beaucoup plus difficile d'observer les corrélations précédentes rencontrées au cours de la carence expérimentale.

6 - FACTEURS D'AGGRAVATION DES TROUBLES DUS A LA CARENCE EXPERIMENTALE EN MAGNESIUM :

Si on augmente la teneur en calcium du régime, la sévérité

des signes de la déficience s'aggrave et la quantité de magnésium qu'il faut ajouter pour obtenir à nouveau un développement satisfaisant, est beaucoup plus importante que si l'apport calcique était normal ou relativement bas.

Chez les rats nourris avec un régime riche en phosphore inorganique apparaissent des lésions rénales avec calcification dans la partie proximale et certains segments de la branche ascendante de l'anse de Henlé. Ces lésions s'aggravent par une déplétion potassique (150). L'hypomagnésémie rend l'animal plus susceptible aux lésions provoquées par le phosphate. La dose de PO_4^{3-} nécessaire pour provoquer de telles lésions est très inférieure en cas d'hypomagnésémie provoquée, à celle qui est nécessaire en son absence. De plus, les lésions sont beaucoup plus importantes et différentes dans la distribution dans le cas d'administration de phosphate, se surajoutant à une carence en magnésium : involution du tube proximal et de la branche ascendante de l'anse de Henlé.

Si, sans modifier la ration calcique normale, on augmente fortement le potassium alimentaire, la croissance du Rat s'arrête et la mortalité augmente, mais le taux de magnésium plasmatique ne change guère. L'addition des deux surcharges potassique et calcique chez les animaux carencés en magnésium, a permis d'obtenir une augmentation considérable des signes de déficience et une chute de la magnésémie (28).

VITALE montre que l'augmentation de 10 à 20 % de l'apport protéique aggrave la sévérité des lésions rénales qui se développent après modification du Mg du régime. Plus la ration protéique est abondante, plus les signes de carence en magnésium apparaissent nettement (29). Parallèlement, le métabolisme protéique, et tout particulièrement l'utilisation des amino-acides, est perturbé en cas de carence magnésique. Des rats que l'on a fait maigrir en les carençant en protéines, ne peuvent récupérer leur

poids, même après rétablissement de la ration protidique normale, si on les prive de Mg (113).

Pour FARNELL, les souriceaux carencés et recevant de la cortisone laissent voir des lésions microscopiques et macroscopiques dans le coeur, le foie et le muscle, plus importantes et plus sévères que celles produites séparément par chaque facteur. La cortisone et la carence en magnésium ont des effets synergétiques. La nature des lésions est identique, seulement les dépôts calcaires rares dans la carence en Mg sont plus fréquents en cas de traitement par la cortisone. Les lésions produites par la cortisone se surajoutant à la carence en Mg, sont plus abondantes dans les muscles travaillant beaucoup, le coeur se trouvant le plus atteint (43).

CONCLUSION

Au terme de cette étude sur la carence expérimentale en magnésium chez les animaux, en particulier chez le Rat, on remarque une chute du taux de cet élément dans le plasma, les globules rouges et les organes étudiés, mais il n'y a aucun parallélisme entre la chute de Mg sérique, du Mg globulaire et celle des tissus mous.

En outre, dans ce dernier cas, il existe une différence entre le coeur, le rein, le foie et le muscle lombaire. Nos expériences ont montré que si la diminution du taux de magnésium hépatique ne pouvait être affirmée, il existait pourtant une importante différence d'activité mitochondriale entre les lots témoins et les lots carencés. Nous avons constaté des foies surchargés en graisse, aussi peut-on penser que la surcharge lipidique est responsable du découplage de la phosphorylation oxydative ; mais la responsabilité de la carence en Mg peut être évoquée par l'intermédiaire d'une inhibition des enzymes lipolytiques.

En régime carencé, la croissance des rats, bien que ralentie, reste nette même après installation des signes de carence cliniques (irritabilité, perte de poids, érythrose) et biologiques (baisse significative du magnésium globulaire et plasmatique).

Certes, il existe une relation entre le métabolisme du Mg et l'activité fonctionnelle de la glande parathyroïde, ne serait-ce que par la diminution du taux de calcium ionisé découlant de l'occupation par le calcium de certains sites protéiques libérés par le Mg ; les travaux antérieurs font penser que l'hypomagnésémie entraîne une activation des parathyroïdes ; nous n'avons pas trouvé d'hyperactivité histologique. Mais ceci n'infirmes pas l'existence de rapports Mg-parathyroïdes. En tout cas, pour les interpréter, il faut tenir compte des modifications secondaires de l'équilibre calcique :

augmentation de l'absorption calcique lors de la carence en Mg, hypercalcémie mais vraisemblablement diminution du taux de calcium ionisé.

C O N C L U S I O N

Le métabolisme du magnésium, constituant essentiellement intracellulaire de l'organisme vivant, reste encore mal connu ou partiellement inexploré ; aussi, les conclusions des travaux qui s'y rapportent apparaissent-elles souvent discordantes, voire contradictoires. Cette situation résulte, pour une bonne part de difficultés ou d'imprécisions rencontrées lors du dosage de cet élément dans les milieux biologiques.

C'est pourquoi nous avons pensé que, grâce aux qualités de la spectrométrie d'absorption atomique, dont nous disposons heureusement dans le laboratoire des Professeurs GIRARD et ROUSSELET, méthode précise, simple, reproductible et ne nécessitant qu'une faible prise d'essai, nous pouvions tenter d'apporter quelques connaissances nouvelles dans l'étude du métabolisme de ce cation, sans dissocier d'ailleurs de cette recherche certains aspects du métabolisme du calcium dont l'interdépendance avec le magnésium est fréquemment constatée.

Nos recherches ont été successivement orientées :

1 - Vers la détermination des diverses formes circulantes du magnésium sérique : ultrafiltrable, complexé, ionisé et lié aux protéines, par l'exploitation des possibilités de fractionnement offertes par de récents procédés analytiques.

- L'ultrafiltration accélérée par centrifugation semble constituer une méthode pratique pour l'évaluation du magnésium ultrafiltrable, dans des conditions, toutefois, de pH et de température requises pour éviter la destruction des fragiles liaisons unissant le magnésium aux protéines. Cette technique présente l'avantage majeur de ne pas nécessiter de réactif exogène, susceptible de modifier l'équilibre naturel des différentes

formes magnésiennes.

- L'échange d'ions avec l'Amberlite IR 120 en phase sodique permet de déterminer le magnésium complexé.

- La chromatographie d'exclusion, même si elle ne peut constituer une méthode pratique d'estimation d'une forme physiologique déterminée du magnésium, permet de confirmer les résultats fournis par l'ultrafiltration. Ainsi, avons-nous pu constater qu'une modification physico-chimique, apparemment aussi faible que la dilution simple, suffisait pour rompre une partie des liaisons du magnésium avec les protéines, et que la séparation par exclusion des protéines et des cations libres conduisait, par suite d'un déplacement d'équilibre, à une rupture complète.

Grâce à cette méthode, nous avons pu encore déterminer dans certaines conditions, le taux maximal de fixation protéique du magnésium et montrer comment la présence de ce cation modifiait le comportement du calcium vis-à-vis des protéines.

On dispose ainsi d'un procédé d'investigation analytique quant au comportement compétitif du magnésium et du calcium vis-à-vis des sites protéiques.

2 - Vers l'étude de certains aspects du métabolisme du magnésium, et plus particulièrement de celui du magnésium cellulaire, de certains tissus mous, chez l'animal d'expérimentation choisi, le Rat souche Wistar.

- Après avoir rappelé l'état actuel des connaissances sur la répartition du magnésium dans l'organisme et présenté nos résultats personnels, nous avons étudié l'influence de la surcharge en vitamine D, seule ou en association avec d'autres traitements tels la radiothyroïdectomie, l'administration de thyroxine ou de benzyl-thiouracile. De nos résultats expérimentaux, il ressort que l'enrichissement en magnésium des tissus

mous sous hypervitaminose D exige l'intégrité anatomique de la thyroïde, bien que la sécrétion de thyroxine ne paraisse pas jouer un rôle essentiel. Un autre facteur endocrinien, peut être du type "thyrocalcitonine", semble donc intervenir, du moins dans ces conditions expérimentales, non physiologiques.

- L'étude de la carence expérimentale en magnésium chez le Rat nous a permis de constater une nette différence de comportement entre le sérum et les cellules ; en effet, la déplétion magnésienne de ces dernières se produit dans une proportion beaucoup plus faible que dans le cas du sérum. En ce qui concerne les globules rouges, les enzymes membranaires réglant les échanges de magnésium se montrent plus sensibles aux effets de la carence que celles des tissus mous, plus résistantes à cette déficience magnésienne.

L'hypercalcémie consécutive à l'hypomagnésémie est confirmée. Deux hypothèses sont susceptibles d'expliquer ce phénomène :

. soit une hyperactivation des parathyroïdes, par suite de l'hypomagnésémie ou de la diminution du taux de calcium ionisé par fixation sur des sites protéiques libérés.

. soit une augmentation d'absorption de cet élément au niveau de l'épithélium intestinal et des tubules rénaux, si on admet toutefois l'existence d'un effet compétitif entre le magnésium et le calcium.

Chez le Rat, l'étude histologique des parathyroïdes n'a montré aucune hyperactivité.

Nous avons, certes, conscience de n'avoir apporté par ce travail qu'une modeste contribution à l'étude biologique du magnésium dont l'intérêt en pathologie ne cesse de croître. Nous espérons, toutefois, pouvoir approfondir dans l'avenir certains problèmes seulement abordés dans cette étude, tels les compétitions se produisant au niveau des sites protéiques entre le magnésium et le calcium, le découplage de la phosphorylation oxydative des mitochondries hépatiques chez les animaux carencés.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - AGNA (J.W.) et GOLDSMITH (R.E.)
Primary hyperparathyroidism associated with hypomagnesemia.
Jour. Clin. Endocr. Met., 1959, 16, 973-974.
- 2 - AIKAWA (J.K.)
Effects of pyridoxine and desoxypyridoxine on magnesium metabolism in the rabbit.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1960, 104, 461-463.
- 3 - AIKAWA (J.K.), GORDON (G.S.) et RHOADES (E.L.)
Mg metabolism in human beings : studies with ^{28}Mg .
Jour. Appl. Physiol., 1960, 15, 503.
- 4 - AMES (A.), SAKANONE (M.)
A new method for preparing a plasma ultrafiltrate, distributions of five electrolytes.
Jour. Lab. Clin. Med., 1964, 64 (1), July, 168-176.
- 5 - AVIOLI (L.V.), LYNCH (T.N.), BASTANSKY (C.)
Tracer-kinetic analysis of ^{28}Mg in Man.
Clin. Res., 1963, 11, 40.
- 6 - AVIOLI (L.V.), LYNCH (T.N.), BERMAN (M.) - Digital computer compartmental analysis of ^{28}Mg kinetics in normal subjects, Paget's disease, and thyroid disease.
Jour. Clin. Invest., 1963, 42 (6), 915.
- 7 - BARNES (B.A.), KRANE (S.M.) et COPE (O.)
Magnesium studies in relation to hyperparathyroidism.
Jour. Clin. Endocr. Met., 1957, 17, 1407-1421.
- 8 - BAUM (P.) et CZOK (R.)
Dosage enzymatique du magnésium ionisé dans le plasma.
Biochem. Z., 1959, 332, 121.
- 9 - BELL (N.H.), BARRETT (R.J.), PATTERSON (R.)
Effect of porcine thyrocalcitonin on serum Ca, P and Mg in the monkey and in man.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1966, 128, 114.

- 10 - BERMAN (E.)
The determination of lead in blood and urine by atomic absorption spectro-
photometry.
Atomic Absorption Newsletters, 1964, 3, 111.
- 11 - BERTHAUX (P.), PAUPE (J.) et MINH (N. T.)
Effets de la parathyroïdectomie et d'un extrait parathyroïdien sur l'élimina-
tion urinaire du Mg
Compt. Rend. Soc. Biol., 1960, 154, 1759-1760.
- 12 - BERTHAUX (P.), PAUPE (J.) et WARGON (H.)
Augmentation de l'élimination rénale du Ca après parathyroïdectomie chez
le Rat blanc.
Compt. Rend. Soc. Biol., 1962, 156, (1), 286.
- 13 - BLAXTER (K.L.), ROOK (J.A.F.)
Energy and carbohydrate metabolism in Mg deficient calves.
Brit. Jour. Nutr., 1955, 9, 121-132.
- 14 - BLAXTER (K.L.), ROOK (J.) et Mc DONALD (A.M.)
Experimental Mg deficiency in calves.
Jour. Compt. Path. Therap., 1959, 64, 157-175.
- 15 - BOHUON (C.)
Microdosage du Mg dans divers milieux biologiques.
Clin. Chim. Acta, 1962, 7, 811-817.
- 16 - BONNER (O.D.) et SMITH (L.L.)
Selectivity scal for some divalent cations on Dowex.
Jour. Phys. Chem., 1957, 61 (1), 326.
- 17 - BONNER (O.D.) , JUMPER (C.F.) et ROGERS (P.C.)
Some cation exchange equilibria.
Jour. Phys. Chem., 1958, 62 (1), 250.
- 18 - BRANDBURY (M.W.B.), KLEEMAN (C.R.), BADDOYAN (H.) and
BERBERIAN (A.)
The Ca and Mg content of skeletal muscle, brain and cerebrospinal fluid as
determined by atomic absorption flame photometry.
Jour. Lab. Clin. Med., 1967, 71, (5), 884-892.
- 19 - BROWN (H.)
The mineral content of human, dog and rabbit skin.
Jour. Biol. Chem., 1926, 68, 729-736.

- 20 - BUGNON (C.), MAURAT (J. P.), LENYS (D.), MOREAU (N.) et ROUSSELET (F.)
Etude de l'origine cytologique de la TCT chez des rats en hypervitaminose D
Compt. Rend. des Séances de Soc. Biol., 1967, 161, (12), 2363.
- 21 - BUNCE (G. E.), JENKIS (K. J.) et PHILIPS (P. H.)
The mineral requirements of the dog - 3 The Mg requirement.
Jour. Nutr., 1962, 76, 17.
- 22 - BUNCE (G. E.), SAUBERLICH (H. E.), REEVES (P. G.) et OBA (T. S.)
Dietary P and Mg deficiency in the rat.
Jour. Nutr., 1965, 86, 406.
- 23 - BURCH (G. E.), LAZZARA (R. K.) and YUN (T. K.)
Concentration of Mg in tissues of the dog.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1965, 118, 581-584.
- 24 - CANTAROW (A.), HAWRY (V. G.) et WHILBECK (C. G.)
Effect of parathyroid hormone on diffusion of Ca, Mg, P.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1938, 39, 15-17.
- 25 - CARE (A. D.), SHERWOOD POTTS (J. T.) and AURBACH (G. D.)
Perfusion of the isolated parathyroid gland of the goat and sheep.
Nature, 1966, 209, 55.
- 26 - CARUBELLI (R.), SMITH (W. O.) et HAMMARSTEN (J. F.)
Determination of Mg in erythrocytes.
Jour. Lab. Clin. Med., 1958, 51, 964-967.
- 27 - CHEEK (D. B.) et TENG (H. C.) - Changes in tissue composition of the rat
in parathyroid intoxication and the effect of Mg loading.
Clin. Sci., 1960, 19, 195.
- 28 - COLBY (R. W.) et FRYE (C. M.)
Effect of feeding various levels of Ca, K and Mg to rats.
Amer. Jour. Physiol., 1951, 166, 209-212.
- 29 - COLBY (R. W.) et FRYE (C. M.)
Effect of feeding high levels of protein and Ca in rat rations on Mg deficiency
syndrom
Amer. Jour. Physiol., 1951, 166, 408-412.
- 30 - COLOWICK (S. P.) et KAPLAN (N. O.)
Methods in enzymology
Vol. X, p. 46.
- 31 - COTLOVE (E.), HOLLIDAY (M. A.), SCHWARTZ (R.) et WALLACE (W. M.)
Effects of electrolyte depletion and acid base disturbance on muscle cations.
Amer. Jour. Physiol., 1951, 167, 665-675.

- 32 - CULLEN (G.E.), WILKINS (W.E.) et HARRISSON (T.R.)
The electrolytes content of hearts and other tissues from cases with various diseases.
Jour. Biol. Chem., 1933, 102, 415-423.
- 33 - CUMMINGS (A.N.), KUFF (L.E.), SOBER (A.H.)
Examination of magnesium binding to serum proteins by ultracentrifugal analysis.
Analytical Biochem., 1968, 22, January, 108-116.
- 34 - DEL CASTILLO(J.) et EUGBAECK (L.)
The nature of the neuromuscular block produced by magnesium
Jour. Physiol., 1954, 124, 370-384.
- 35 - DENIS (W.)
Determination of Mg in blood plasma and serum
Jour. Biol. Chem., 1922, 52, 411-415.
- 36 - DINE (R.F.) and LAVIETES (P.H.)
Serum Mg in thyroid disease
Jour. Clin. Invest., 1942, 21, 781-786.
- 37 - DOE (R.P.), FLINCK (E.B.) et PRASAD (A.S.)
Magnesium metabolism in hyperparathyroidism
Jour. Lab. Clin. Med., 1959, 54, 805.
- 38 - DREUX (C.) et GIRARD (M.L.)
Magnesium plasmatique et globulaire
Ann. Biol. Clin., 1961, 19, 636.
- 39 - DUCKWORTH (J.) et WARNOCK (G.M.)
Mg requirements of man in relation to Ca requirement.
Nutr. Abst. and Rev., 1942,-43, 12, 167-183.
- 40 - DUNN (M.J.) et WALSER (M.)
Magnesium depletion in normal man
Metabolism, 1966, 15, 884-895.
- 41 - DURLACH (J.), SVOLIAROFF (M.), GAUDUCHON (J.), LELUC (R.) et THUONG CONG-TRIEN.
Etudes sur les rapports entre parathyroïdes et métabolisme du magnésium.
Ann. Endocr., 1960, 21, 235.
- 42 - ERDMANN
Glycerophosphataspaltung durch nierenphosphatase und ihre aktivierung
Z. Physiol. Chem., 1927, 172, 182.

- 43 - FARNELL (D.)
Cortisone treatment in Mg deficiency of rats.
Amer. Jour. Vet. Res., 1968, Aug., 29, 1695-1706.
- 44 - FOURMAN (P.)
L'insuffisance parathyroïdienne et la tétanie chronique constitutionnelle.
Path. Biol., 1962, 10, 1013.
- 45 - FRIZEL (D. E.), MALLESON (A. G.), MARKS (V.)
Measurement of plasma ionised Ca and Mg by ion exchange strip.
Clinica Chimica Acta, 1967, 1, 16.
- 46 - GILL (J. R.), BELL (N. H.) et BARTER (F. C.)
Effect of parathyroid extract on Mg excretion in man.
Jour. Appl. Physiol., 1967, 22, 136.
- 47 - GIRARD (M. L.) et ROUSSELET (F.)
L'absorption atomique au service de la biologie. Détermination du calcium et du magnésium.
Ann. Pharm. Franç., 1967, 25, n° 4, 271-283.
- 48 - GIRARD (M. L.), ROUSSELET (F.), DESCUBE (J.)
Précisions nouvelles sur la répartition du magnésium sanguin apportées par la spectrophotométrie d'absorption atomique.
Compt. Rend. de l'Académie des Sciences, 1966, 262, 2380-2382.
- 49 - GITELMAN (H. J.) and
Inhibition of parathyroid gland activity by hypermagnesemia
Amer. Jour. Physiol., 1968, Aug., 215, 483-585.
- 50 - GITELMAN (H. J.), KUKOLJ (S.) and WELT (L. G.)
Inhibition of parathyroid gland fonction in hypermagnesemia
Fed. Proc., 1966, 25 (1), 495.
- 51 - GITELMAN (H. J.), KUKOLJ (S.) and WELT (L. G.) - The influence of parathyroid glands on the hypercalcemia of experimental Mg depletion in the Rat.
Jour. Clin. Invest., 1968, 47 (1), 118-126.
- 52 - GOTZE (H. R.) et WOMERLEY (R. A.)
Interrelations of Mg and citrate metabolism.
Clin. Sci., 1963, 24, (3), 319
- 53 - GOUNNELLE (J. C.) et RAOUL (Y.)
Effets de la vitamine D sur la répartition intracellulaire hépatique du Ca et du Mg chez le Rat.
Compt. Rend. Soc. Biol., 1967, 16 (2), 995.

- 54 - GREENBERG (D. M.) et MAC KEY (M. A.)
The effect of parathyroid extract on blood magnesium
Jour. Biol. Chem., 1932, 98, 765-768.
- 55 - HANNA (S.)
Influence of large doses of vitamin D on magnesium metabolism in rats.
Metabolism, 1961, 10, 735-743.
- 56 - HANNA (S.) Mc INTYRE (I.), NORTH (K. A.) et FRASER (R.)
Magnesium metabolism in parathyroid disease.
Brit. Med. Jour., 1961, 2, 1253.
- 57 - HARMON (M.)
Parathyroid adenoma in a child
Amer. M. A. Jour. Dis. Child., 1956, 91, 313-325.
- 58 - HAY (M.)
The action of saline cathartics
Jour. Anat. and Physiol., 1882, 16, 596-599.
- 59 - HEATON (F. W.)
The parathyroid glands and Mg metabolism in the Rat.
Clin. Sci., 1965, 28, 543.
- 60 - HEATON (F. W.)
The determination of ionized Mg in serum and urine.
Clin. Chim. Acta, 1967, 1, 15.
- 61 - HEATON (F. W.) et ANDERSON (C. K.) - The mechanism of renal calcification induced by Mg deficiency in the Rat.
Clin. Sci., 1965, 28, 99.
- 62 - HEATON (F. W.), HODKINSON (A.) and ALAN ROSE
Observation on the relation between calcium and magnesium metabolism in man.
Clin. Sci., 1964, 27, 1.
- 63 - HEATON (F. W.) et PIRAH (L. N.)
Mg metabolism in patients with parathyroid disorders.
Clin. Sci., 1963, 25, 475.
- 64 - HEGGTVEIT (H. A.), BAJUSZ (E.)
Electrolytes in cardiovascular diseases.
S. Karger Basel, New-York, 1965, p. 204.

- 65 - HEGGTVEIT (H. A.), HERMAN (L.) et MISHRA (R. K.)
Cardiac necrosis and calcification in experimental Mg deficiency
Amer. Jour. Path., 1964, 45, 757.
- 66 - HELFFERICH
Ionen austauscher
Verhag Chemie Weinheim, 1959.
- 67 - HESS (R.), Mc INTYRE (I.), ALCOCK (N.) et PEARSE (A. G. E.)
Histochemical changes in rat Kidney in magnesium deprivation.
Brit. Jour. Exper. Path., 1959, 40, 80-86.
- 68 - HIROCHI ITO
Magnesium metabolism in thyroid dysfunction
Tohoku Jour. Exp. Med., 1968, 96, 1-14.
- 69 - HJERTEN (S.) et MOSBACH (R.)
"Molecular sieve" chromatography of proteins
Anal. Biochem., 1962, 3, 109.
- 70 - HOLLENDER (L. F.) et JANSER (J.)
Les hypomagnésémies chez le malade chirurgical
Mém. Ac. Chirurgie, 1965, 91, 1047-1061.
- 71 - HOWLAND (J.), MARIOTTE (W.)
A micro-method for the determination of Ca and Mg in blood serum.
Jour. Biol. Chem., 1917, 32, 233.
- 72 - JERRY (G.), CHUTKOW (M. D.)
Studies on the metabolism of Mg in the Mg deficient Rat.
Jour. Lab. Clin. Med., 1965, June, 912-926.
- 73 - JERRY (G.), CHUTKOW (M. D.), SANFORD MEYERS (S. B.)
Chemical changes in the cerebrospinal fluid and brain in Mg deficiency
Neurology, 1968, oct., 8, 963-974.
- 74 - JOLYET (F.) et CAHOURS
Sur l'action physiologique des sulfates de potasse, de soude et de magnésie
en injection dans le sang.
Arch. Physiol. Norm. et Path., 1869, 2, 113-120.
- 75 - JONES (J. E.), DESPER (P. C.), SHANE (S. R.) et FLINK (E. B.)
Magnesium metabolism in hyperparathyroidism and hypoparathyroidism.
Jour. Clin. Invest., 1966, 45, 891-900.

- 76 - KASHIWA (H. K.)
Mg deficiency in intact, in adrenalectomized and hypophysectomized Rats.
Endocrinology, 1961, 68 (1), 80.
- 77 - KATZMAN (R.)
Effect of electrolyte disturbance on the central nervous system.
Ann. Rev. Med., 1966, 17, 197.
- 78 - KENNY (A. D.)
Urinary Ca response to chronic parathyroidectomy in rats.
Endocrinology, 1966, 79 (1), 77-80.
- 79 - KLEIN (D. C.), MORIC (H.), TALMAGE (R. N.)
Effect of thyrocalcitonin administrated during peritoneal lavage.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1967, 124, 627.
- 80 - KLEIN (B.) et OKLANDER (M.)
The automated fluorometric determination of serum Mg.
Clin. Chem., 1967, 13, (4), 26-35.
- 81 - KO (K. W.), FELLERS (F. X.) et CRAIG (J. M.)
Observations on Mg deficiency in the rat.
Lab. Invest., 1962, 11, 294.
- 82 - KO (K. W.), YAFFE (S. J.), CRAIG (J. M.) et FELLERS (F. X.)
Structural and functional changes in the Kidney of Mg deficient Rats.
Clin. Res., 1960, 8, 229.
- 83 - KRUSE (H. D.), ORENT (E. R.) et Mc COLLUM (E. V.)
Studies on Mg deficiency in animals
Jour. Biol. Chem., 1932, 96, 519-539.
- 84 - KRUSE (H. D.), ORENT (E. R.) et Mc COLLUM (E. V.)
Chemical changes in the blood following magnesium deprivation
Jour. Biol. Chem., 1933, 100, 603-643.
- 85 - LARVOR (P.), GIRARD (A.), BROCHARD (M.)
Interference entre la carence en Mg et le métabolisme du Ca.
Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 1964, 4, 382.
- 86 - LARVOR (P.), GIRARD (A.) et BROCHARD (M.)
Etude de la carence expérimentale en magnésium chez le Veau.
Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 1964, 4, 371-382.

- 87 - LARVOR (P.), GIRARD (A.), BROCHARD (M.), PARODI (A.), ZEVESTRE (J.)
Etude de la carence expérimentale en Mg chez le Veau
Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 1964, 4, 345-369.
- 88 - LEESON (P. M.) et FOURMAN (P.)
Increased sensitivity to vitamin D after vitamin D poisoning.
Lancet, 1966, 1, 1182.
- 89 - LEROY (J.)
Nécessité du Mg pour la naissance de la souris
Compt. Rend. Soc. Biol., 1926, 94, 431-433.
- 90 - LIFSHITZ (F.), HARRISSON (H. C.), BULL (E. C.) et HARRISSON (H. E.)
Citrate metabolism and the mechanism of renal calcification induced
by Mg depletion
Metabolism, 1967, 16, 345.
- 91 - LIFSHITZ (F.), HARRISSON (H. C.), HARRISSON (H. E.)
Response to vitamin D of magnesium deficient rats.
Proc. Soc. Exp. Med., 1967, 125, 472.
- 92 - LOGAN (M. A.)
The early effects of parathyroid hormon on the blood and urine
Jour. Biol. Chem., 1939, 127, 711-719.
- 93 - LOHMANN
Untesuchungen über die chemische Natur des koferments der Milchsäure-
bildung
Biochem. Z, 1931, 237, 445.
- 94 - LOMAX (G. D.)
Determination of protein-bound Mg and Ca by gel filtration
Jour. Med. Lab. Tech., 1967, 24 (2), 103-112.
- 95 - LOWENHAUPT (E.), SCHULMAN (M. P.) et GREENBERG (D. M.)
Basic histologic lesions of magnesium deficiency in Rat
Arch. Path., 1950, 49, 427.
- 96 - LUMB (G. A.)
Determination of ionic calcium in serum
Clin. Chim. Acta, 1963, 8, 33-38.
- 97 - MAC LEOD (L. D.)
Ionized Ca and Mg in serum
Clin. Chim. Acta, 1961, 6, 861.

- 98 - MAC MANUS (J.) et HEATON (F. W.)
The effect of Mg deficiency on Ca homeostasis in the Rat
Clin. Sc., 1969, 36, 247-306.
- 99 - MAGNUS LEVY (A.)
Ueber den gebalt normaler men schlicher organe an chlore, calcium,
magnesium and eisen sourie an wasser eiweis an lett.
Biochem. Z., 1910, 24, 363-380.
- 100-MANITIUS (A.) et EPSTEIN (F.H.)
Some observations on the influence of e Mg deficient diet on rats
Jour. Clin. Invest., 1963, 42, 208.
- 101-MANITIUS (A.), LEVITIN (H.), BECK (D.) et EPSTEIN (F.H.)
On the mechanism of impairment of renal concentrating ability in
K deficiency
Jour. Clin. Invest., 1960, 39, 684.
- 102-MANITIUS (A.), LEVITIN (H.), BECK (D.) et EPSTEIN (F.H.).
On the mechanism of impairment of renal concentrating ability in hyper-
calcemia
Jour. Clin. Invest., 1960, 39, 693.
- 103-MANN (C. K.) et YOE (J. H.)
Spectrophotometric determination of Mg.
Ann. Chem., 1956, 28, 202.- 205.
- 104-MARTINDALE (L.) and HEATON (F. W.)
Magnesium deficiency in the adult rat.
Biochem. Jour., 1964, 92, 119-126.
- 105-MASSON (M.)
Dosage du Mg sanguin
Rev. Franç. Et. Clin. Biol., 1957, 2, 413-415.
- 106-MAURAT(J. P.)
Le Mg en pathologie
Expansion Scientifique Française, Paris, 1958.
- 107-MAURAT (J. P.)
Le dosage du magnésium globulaire
Rev. Path. Comp., 1964, 64, 423-426.
- 108-MAURAT (J. P.), BERTHAUX (P.), DEVILLECHABROLLE (A.)
Effet de la parathyroïdectomie sur l'adaptation de la calciurie avec un régime
pauvre en Ca chez le Rat blanc
Compt. Rend. Soc. Biol., 1965, 159 (1), 310.

- 109-MAURAT (J. P.), BUGNON (C.), ROUSSELET (F.), VOSKIAN (H.),
MOREAU (N.), GIRARD (M. L.)
Effets de l'hypervitaminose D sur la teneur en Mg du coeur, du rein, du
muscle squelettique du Rat. Incidence de la surcharge en thyroxine et de la
radiothyroïdectomie.
Compt. Rend. Acad. Sc., 1969, 268, 427-430.
- 110-MAURAT (J. P.), ROUSSELET (F.)
Métabolisme du magnésium
Problèmes actuels de biochimie appliquée, 1969, 2ème série, Masson, 173.
- 111-Mc INTYRE (I.), BOSS (S.) et TROUGHTON (V. A.)
Parathyroid hormone and Mg homeostasis
Nature, 1963, 198, 1058.
- 112-Mc INTYRE (I.), DAVIDSON (D.)
The production of secondary depletion, sodium retention, nephrocalcinosis
and hypercalcemia by magnesium deficiency
Biochem. Jour., 1958, 70, 456-462.
- 113-MENAKER (W.) et KLEINER (E. S.)
Effect of deficiency of magnesium and other minerals on protein synthesis
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1952, 81, 377-378.
- 114-MOORE (L. A.), HALLMAN (E. T.) et SHOLL (L. B.)
Cardiovascular and other lesions in calves fed diets in magnesium
Arch. Path., 1938, 26, 820-838.
- 115-MORRIS (E. R.) et O'DELL (B. L.)
Effect of magnesium deficiency in guinea pigs on kidney function plasma
ultrafiltrable ions.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1970, 132, 105-110.
- 116-MOSINGER (B.)
Lipolytic action of EDTA and catechol amines in intact and homogenized
adipose tissue.
Life Sci., 1969, 8, (4), 137-146.
- 117-MOSS (D. W.) - The influence of metal ions on the orthophosphatase and
inorganic pyrophosphatase activities of human alkaline phosphatase.
Jour. Biochem., 1969, 112 (5), 22 P
- 118-MUGER (B. L.) and ROTH (S. I.)
The cytology of the normal parathyroid gland of man and virginia deer.
Jour. Cel. Biol. 1963, 16, 379-400.

- 119-MUNDAY (K. A.) et MAHY (B. W. J.)
Determination of ultrafiltrable Ca and Mg on small quantities of plasma.
Clin. Chim. Acta, 1964, 10, 144.
- 120-PALMIERI (G. M. A.), THOMPSON (J. S.) et ELIEL (L. P.)
Modifications of plasma Mg by thyrocalcitonin parathyroid extract and
cortisone.
Endocrinology, 1969, 84 (2), 1509.
- 121-PARKER (H. E.)
Mg, Ca and Zn in animal Nutrition
Atomic Absorption Newsletters, 1963, 2 (13),23.
- 122-PARKER (R.), HIOCO (D.) et LEBLANC (R.)
Les troubles du métabolisme magnésien.
Rev. Franç. Endoc. Clin., 1963, 4, 335-359.
- 123-PARR (W. H.)
Hypomagnesaemic tetany in calves fed on milk diets.
Vet. Rech., 1957, 69, 71.
- 124-PORATH (J.)
Some recent developments in preparative electrophoresis and gel filtration.
Metabolism, 1964, 13, 1004.
- 125-PEDERSEN (K. O.)
Exclusion chromatography
Arch. Biochim. Biophys., 1962, suppl., 1, 157.
- 126-PRASAD (A. S.), FLINCK (E. B.) and COLLISTER (M. R.)
Ultrafiltration studies on serum mangesium in normal and diseased states.
Jour. Lab. Clin. Med., 1961, 58, 531-541.
- 127-PETERS (J. P.), ELSERSON (L.)
The influence of protein and inorganic phosphorus on serum calcium
Jour. Biol. Chem., 1929, 84, 155.
- 128-PETERSEN (V. P.)
Metabolic studies in clinical magnesium deficiency
Acta Med. Scand., 1963, 173, 285-298.
- 129-PETERSEN (V. P.)
Potassium and magnesium turnover in magnesium deficiency
Acta Med. Scand., 1963, 174, 595-604.

- 130-PIGNARD (P.)
Microdosage colorimétrique du magnésium sanguin par la 8 hydroxyquinoléine
Bull. Soc. Chim. Biol., 1950, 32, 401-408.
- 131-POTTS (J. T.) et ROBERTS (B.)
Clinical significance of Mg deficiency and its relation to parathyroid disease
Amer. Jour. Med. Sci., 1958, 235, 206-219.
- 132-RASMUSSEN (H.), FISHER (J.) et ARNAUD (C.)
Parathyroid hormon, ion exchange and mitochondrial swelling
Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1964, 52, 1198-1203.
- 133-RICHARDSON (J. A.), HUFFINES (W. D.), WELT (L. G.)
The effect of coincident hypercalcemia and K depletion on the rat Kidney.
Metabolism, 1963, 12, 560
- 134-RICHARDSON (J. A.) and WELT (L. G.)
The hypomagnesemia of vitamin D administration
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1965, 118, 512-514.
- 135-RICHER
Perinatal steroids and reproduction
Rev. canad. de Biol., 1967, 26, 251.
- 136-RINGBOM (A.)
Les complexes en chimie analytique
Ed. Dunod, 1967, p. 178-188.
- 137-RINGBOM (A.)
Les complexes en chimie analytique
Ed. Dunod, 1967, p. 188-190.
- 138-RINGBOM (A.)
Les complexes en chimie analytique
Ed. Dunod, 1967, p. 331-334.
- 139-RINGBOM (A.)
Treatis on analytical chemistry
Part. I, Vol. 1, Ch. 14, 1959
Interscience New-York-London
- 140-RIZEK (J. E.), DIMICH (A.), WALLACH (S.)
Le Mg du plasma et des érythrocytes dans les affections thyroïdiennes
Jour. Clin. Endocr., 1965, 25, 350.

- 141-ROBERTS (B.), MURPHY (J. J.), MILLER (L.) et ROSENTHAL (O.) - The effect of parathyroid hormone upon serum levels and urinary excretion of Mg.
Surg. Forum, 1954, 5, 509.
- 142-ROOK (J. A. F.)
Experimental Mg deficiency in the cow.
Jour. Comp. Path. Therap., 1963, 73, 93.- 97.
- 143-TOTH (S. I.), KUNIN (A. S.), FRANE (S. M.), RAISZ (L. G.)
Effect of dictary deficiency in vitamin D calcium and phosphorus of the Rat parathyroid gland
Amer. Jour. Path., 1968, 53, (4), 631-636.
- 144-ROUSSELET (F.)
Spectrophotométrie par absorption atomique appliquée à la biologie.
Contribution instrumentale et analytique
Thèse d'Etat, Sédès, Paris, 1966.
- 145-SALET (J.), POLONOVSKY (C.), GOUGON (F. De.), PEANG (G.), MELCKIAN(B.) et FOURNET (J. P.)
Tétanie récidivante par hypomagnésémie congénitale. Une maladie métabolique nouvelle.
Arch. Franç. Pédiatr., 1966, 23, 749-768.
- 146-SCHACHTER (D.)
Fluorometric estimation of Mg with 8 hydroxy 5 quinoline sulfonate
Jour. Lab. Clin. Med., 1961, 58 (3), 495-498.
- 147-SCHILS M.
Species differences in electrolytes.
Fed. Proc., 1966, 25 (1), 609.
- 148-SCHIRARDIN (H.), METAIS (P.)
Une méthode simple de détermination des fractions du calcium plasmatique
Ann. Biol. Clin., 1959, 7-9, 465-474.
- 149-SCHNEEBERGER (E. F.) et MORRISON (A. B.)
The nephropathy of experimental Mg deficiency.
Lab. Invest., 1965, 14, 674.
- 150-SCHNEEBERGER (E. F.), MORRISON (A. B.)
Increased susceptibility of Mg deficient rats to a phosphate induced nephropathy.
Amer. Jour. Path., 1967, 50, (4), 549.
- 151-SCHWARZENBACH (G.)
Complexone
Experientia Suppl., 1956, 5, 162.

- 152 - SETA (K.), HELLERSTEIN (E.E.) et VITALE (J.J.)
Myocardium and plasma electrolytes in dietary Mg and K deficiency in the rat.
Jour. Nutr., 1965, 87, 179.
- 153 - SHILS (M.E.)
Experimental human Mg depletion. Clinical observation and blood chemistry alterations.
Amer. Jour. Nutr., 1964, 15, 133.
- 154 - SILVERMAN (H.S.), GARDNER (I.L.)
Ultrafiltration studies on serum Mg.
New Eng. Jour. Med., 1954, 3 (VI), 250, 938-942.
- 155 - SIMONSEN (D.), WESTOVER (L.) et WERTMAN (M.)
Determination of serum Mg by molybdivanadate.
Jour. Biol. Chem., 1947, 169, 39-47.
- 156 - SJOLLEMA (B.)
Nutritional and metabolic disorders in cattle
Nutrition Abstr. Rev., 1932, 1, 621-632.
- 157 - SMITH (R.H.)
Importance of magnesium in the control of plasma calcium in the calf.
Nature, 1961, 191, 181-182.
- 158 - SMITH (W.O.), BAXTER (D.J.), LINDNER (A.), GINN (A.E.)
Effect of Mg depletion on renal function in the rat.
Jour. Lab. Med., 1962, 59, 211-219.
- 159 - SOFFER (L.J.), DANTES (D.A.), GROSSMAN (E.B.), SOBOTKA (H.) et JACOBS (M.)
Ultrafiltrable magnesium in hyperparathyroidism.
Jour. Clin. Invest., 1939, 18, 597-601.
- 160 - STERRE (R.L.), ACKERS (G.K.)
Restricted diffusion chromatography trough column of granulated Agar gel
Nature, 1962, 196, 475.
- 161 - STEWART (J.), REITH (J.W.S.)
The effects of Mg liming on the Mg content of pasture and the blood level of Mg in cows.
Jour. Comp. Path. Therap., 1956, 66, 1 - 9.
- 162 - TALMAGE (R.V.), KRAINTZ (F.W.)
Progressive changes in renal P, Ca excretion in rats following parathyroidectomy or parathyroid administration.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1954, 87, 263.

- 163-THOMAS (J.), DREUX (C.), SAVEL (J.), CLOSTRE (F.), ABOULKER (P.)
Magnésium globulaire dans la lithiase rénale.
Jour. Urologie, 1963, 69, 584-594.
- 164-TIBBETTS (D. M.), AUB -J. C.)
Magnesium metabolism in health and disease.
Jour. Clin. Invest., 1937, 16, 491-501.
- 165-TORIBARA (T. Y.), TEREPAKA (A. R.) et DEWEY (P. A.)
The ultrafiltration calcium of human serum
Jour. Clin. Invest., 1957, 36, 378.
- 166-TUFTS (E. V.) et GREENBERG (D. M.)
Calcium involvement in Mg deficiency
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1936, 34, 292-294.
- 167-TUFTS (E. V.) et GREENBERG (D. M.)
The biochemistry of Mg deficiency
Jour. Biol. Chem., 1938, 122, 693-726.
- 168-UNSITALO (E.)
Cité par RIZEK. - The thermodynamics of the formation of metal chelates.
Ann. Acad. Sci. Fennicae. Ser A., 1957, II, 87.
- 169-VELLUZ (L.)
Technique de microdosage du Mg dans le sérum sanguin.
Compt. Rend. Soc. Biol., 1934, 115, 253-254.
- 170-VITALE (J. J.), HELLESTEIN (E. E.), HEGSTED (D. M.), NAKAMURA (M.)
et FARBMAN (A.)
Studies on the interrelation ship between dietary Mg and Ca in atherogenesi
and renal lesions.
Amer. Jour. Clin. Nutr., 1959, 7, 13-22.
- 171-VITALE (J. J.), HELLERSTEIN (E. E.), NAKAMURA (M.) et LOWN (B.)
Effects of Mg deficient diet upon puppies.
Circ. Res., 1961, 9, 387.
- 172-VITALE (J. J.), NAKAMURA (M.), HEGSTED (D. M.)
The effect of Mg deficiency on oxydative phosphorylation.
Jour. Biol. Chem., 1957, 228, 573.
- 173-VITALE (J. J.), VELEZ (H.), GUZMAN (C.) et CORREA (P.)
Magnésium deficiency in the cebus monkey.
Cir. Res., 1963, 12, 642-649.
- 174-WALLACH (S.), BELLAVIA (J. V.), GAMPONIA (P. J.)
Cellular Mg transport in hypermagnesemia.
Clin. Res., 1965, 13, 239.

- 175-WALLACH (S.), BELLAVIA (J.V.), SCHORR (J.) et REIZENSTEIN (D.L.)
Tissue distribution of electrolytes ^{47}Ca and ^{28}Mg in acute hypercalcemia.
Amer. Jour. Physiol., 1964, 207, 553.
- 176-WALLACH (S.), BELLAVIA (J.V.), SCHORR (J.) et SCHAFFER (A.)
Tissue distribution of electrolytes ^{47}Ca and ^{28}Mg in experimental hyper and hypoparathyroidism.
Endocrinology, 1966, 78, 16-27.
- 177-WALLACH (S.), CAHIL (L.N.), ROGAN (F.H.), JONES (H.L.)
Plasma and erythrocyte magnesium in health and disease.
Jour. Lab. Clin. Med., 1962, 59, 195-210.
- 178-WASSERMAN (R.H.)
Vitamin D dependent calcium binding protein
Jour. Biol. Chem., 1968, 243, (14), 3978-3986.
- 179-WASSERMAN (R.H.) and TAYLOR (A.N.)
Vitamin D dependent calcium binding protein
Jour. Biol. Chem., 1968, 243 (14) 3987-3993.
- 180-WATCHORN (E.) et Mc CANCE (R.A.)
Subacute Mg deficiency in rats.
Jour. Biochem., 1937, 31, 1379-1390.
- 181-WELT (L.G.)
Experimental Mg depletion
Yale Jour. Biol. Med., 1964, 36, 325.
- 182-WENER (J.), PINTAR (K.), SIMON (M.A.), MOTOLA (R.), FRIEDMAN (R.)
et SCHUCHER (R.) - The effect of prolonged hypomagnesemia on the
cardiovascular system in young dogs.
Amer. Heart Jour., 1964, 67, 221.
- 183-WHANG (R.), MOROSI (H.J.), RODGERS (D.), REYES (R.)
The influence of sustained Mg deficiency on muscle K repletion.
Jour. Lab., Clin. Med., 1967, 70 (6), 895-902.
- 184-WHANG (R.) et WELT (L.G.)
Observations in experimental Mg depletion
Jour Clin. Invest., 1963, 42, 305.

185-WILLIS (J. B.)

The determination of metals in blood serum by atomic absorption spectroscopy.

Spectrochimica Acta, 1960, 16, 273.

186-WOODS (K. R.)

Magnesium metabolism studies

Thèse Univ. de Minnesota, 1955, Michigan.

187-WORKER (N. A.) et MIGICOVSKY (B. B.)

Effect of vitamin D on the utilisation of beryllium, magnesium, calcium, strontium and barrium in the chick.

Jour. Nutr., 1961, 74, 490-494.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

Connaissances actuelles sur le rôle du Magnésium en Biologie en liaison avec celui du calcium.....	1
---	---

PREMIERE PARTIE

Moyens d'étude du Magnésium dans les milieux biologiques. Etude comparée avec celle du Calcium.....	4
<u>Premier chapitre :</u>	
Dosage global du magnésium et du calcium dans les milieux biologiques.....	5
1 - <u>Dosage du magnésium</u>	5
1 - 1 - Principales techniques.....	5
1 - 2 - Spectrophotométrie d'absorption atomique...	6
1 - 2 - 1 - Principe.....	7
1 - 2 - 2 - Lampe.....	8
1 - 2 - 3 - Flamme.....	8
1 - 2 - 4 - Brûleur.....	8
1 - 2 - 5 - Interactions.....	8
1 - 2 - 6 - Méthode.....	8
2 - <u>Dosage du calcium</u>	10
2 - 1 - Lampe.....	11
2 - 2 - Flamme.....	11
2 - 3 - Interactions.....	11
2 - 4 - Méthode proposée.....	13
3 - <u>Application particulière aux tissus</u>	14

Deuxième chapitre

Essai de détermination des différents états physico-chimiques
du magnésium et du calcium dans le sérum sanguin.

Introduction	15
1 - <u>Ultrafiltration accélérée par centrifugation</u>	17
1 - 1 - Matériel	18
1 - 2 - Mode opératoire	19
1 - 3 - Résultats	20
1 - 4 - Mise en évidence de la fragilité des liaisons protéine-métal	22
1 - 5 - Effet de la surcharge en magnésium et en calcium in vitro sur le taux de l'ultrafiltrable de ces éléments	25
1 - 6 - Influence du pH sur les liaisons métal-protéines	26
1 - 7 - Technique proposée	28
2 - <u>Filtration sur gel Sephadex</u>	30
2 - 1 - Principe	30
2 - 2 - Matériel utilisé	31
2 - 3 - Mode opératoire	31
2 - 3 - 1 - Préparation de la colonne	31
2 - 3 - 2 - Déroulement de la chromatographie	32
2 - 3 - 3 - Analyse des fractions	32
2 - 4 - Expériences et résultats	33
2 - 4 - 1 - Filtration sur gel en milieu isotonique... dépourvu de Mg^{++} et de Ca^{++}	34
2 - 4 - 2 - Filtration sur gel en milieu isotonique tamponné dépourvu de Mg^{++} et de Ca^{++} ..	35
2 - 4 - 3 - Filtration sur gel avec un liquide d'élution renfermant 2,4 mg/l de Mg^{++}	38
2 - 4 - 4 - Filtration sur gel avec un éluant renfermant 4 mg/l de Ca^{++}	41
2 - 4 - 5 - Expériences conduites en présence d'une concentration fixe en Mg^{++} et de propor- tions variables de Ca^{++}	44

Conclusion.....	50
3 - <u>Analyse par échange d'ions</u>	52
3 - 1 - Rappel des équations fondamentales de l'équilibre dans les phénomènes d'échange d'ions.....	52
3 - 2 - Technique d'échange d'ions sur résine.....	55
3 - 2 - 1 - Préparation de la résine.....	55
3 - 2 - 2 - Mode opératoire.....	55
3 - 2 - 3 - Résultats.....	56
3 - 3 - Equilibre en présence d'agents complexants....	60
3 - 3 - 1 - Réaction de formation de complexes Terminologie et considérations générales	61
3 - 3 - 2 - Echange d'ions en présence d'agent complexant.....	63
3 - 3 - 2 - 1 - E D T A.....	64
3 - 3 - 2 - 2 - Ion citrate.....	67
3 - 3 - 2 - 3 - Ion tartrate.....	68
3 - 4 - Etude particulière du "phénomène citrate".....	68
3 - 4 - 1 - Variation du pH de la solution citrate à concentration constante.....	71
3 - 4 - 1 - 1 - Soluté d'électrolytes.....	72
3 - 4 - 1 - 2 - Sérum sanguin.....	75
3 - 4 - 2 - Paramètres propres à la résine.....	75
3 - 4 - 2 - 1 - Pouvoir de fixation résiduel de la résine.....	80
3 - 4 - 2 - 2 - Effet de la saturation en ion alcalin de la résine.....	81
3 - 4 - 2 - 3 - Influence de la nature de l'ion alcalin sur les échanges de Mg et de Ca avec la résine.....	83

3 - 4 - 2 - 4 - Influence du temps de contact....	87
<u>Technique de dosage du magnésium sérique naturellement</u> <u>complexé</u>	88
Conclusion.....	89
Conclusion générale.....	90
<u>DEUXIEME PARTIE</u> =====	
Application des moyens analytiques à l'étude expérimentale de certains aspects du métabolisme du magnésium.....	92
<u>Premier chapitre</u>	
Répartition physiologique du magnésium de l'organisme	93
Le magnésium osseux.....	96
Le magnésium sanguin.....	96
Le magnésium des tissus mous.....	97
<u>Deuxième chapitre</u>	
Influence de la vitamine D et de la Thyroïde sur le métabolisme du magnésium.....	101
1 - <u>Etat actuel des connaissances</u>	101
1 - 1 - Surcharge en vitamine D.....	101
1 - 2 - Interrelation entre vitamine D et parathyroïdes....	102
1 - 3 - L'avitaminose D.....	103
1 - 4 - Effets de la thyroïde sur le métabolisme du Mg....	105
2 - <u>Expériences personnelles</u>	107
2 - 1 - Conduite des expériences.....	108
2 - 2 - Résultats.....	109
2 - 2 - 1 - Surcharge en vitamine D.....	109
2 - 2 - 1 - 1 - Teneur en magnésium des organes	109
2 - 2 - 1 - 2 - Teneur en calcium des organes...	115
2 - 2 - 2 - Radiothyroïdectomie par ^{131}I	118
2 - 2 - 2 - 1 - Radiothyroïdectomie seule	118

2 - 2 - 2 - 2 - Radiothyroïdectomie associée à la vitamine D.....	120
2 - 2 - 3 - Effet de la thyroxine.....	127
2 - 2 - 3 - 1 - Magnésium.....	127
2 - 2 - 3 - 2 Calcium.....	128
2 - 3 - Discussion.....	131
2 - 4 - Conclusion.....	133

Troisième chapitre

Etude de la carence en magnésium.....	135
1 - <u>Etudes expérimentales</u>	135
2 - <u>Modifications biologiques</u>	138
3 - <u>Lésions histologiques provoquées par la carence en magnésium</u>	142
3 - 1 - Lésions cardio-vasculaires.....	142
3 - 2 - Lésions rénales.....	143
3 - 3 - Durée de vie des érythrocytes.....	144
3 - 4 - Action du magnésium au niveau des mitochondries	145
4 - <u>Apports personnels</u>	146
4 - 1 - Matériel expérimental.....	146
4 - 2 - Résultats.....	147
4 - 2 - 1 - Croissance des rats sous régime carencé..	147
4 - 2 - 2 - L'aspect clinique.....	148
4 - 2 - 3 - Variation du taux de magnésium..... tissulaire et sanguin.....	148
4 - 2 - 4 - Etude de la respiration des mitochondries de foie de rats élevés en régime hypomagné- sique.....	156

5 - <u>Etude des interrelations entre la carence en magnésium et la parathyroïde, le métabolisme du calcium et du potassium</u>	161
5 - 1 - Carence magnésique et parathyroïde.....	161
5 - 2 - Carence en magnésium : rapports entre troubles du métabolisme du magnésium et du calcium.....	167
5 - 3 - Physiopathologie de la néphrocalcinose au cours de la déficience en magnésium;.....	172
5 - 4 - Rapports entre potassium et carence en magnésium.....	173
6 - <u>Facteurs d'aggravation des troubles dus à la carence expérimentale en magnésium</u>	176
Conclusion.....	179
CONCLUSION.....	181
BIBLIOGRAPHIE.....	185
TABLE DES MATIERES.....	203

Vu et Permis d'Imprimer
Paris le 11 Mar 1970
Le Doyen.



P. Malangeau

P. MALANGEAU

